

Methoden zur Immobilisierung
von Proteinen
auf Polyurethan- und Goldoberflächen
und ihr Einfluss
auf Konformation und Aktivität der Proteine

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

Vorgelegt dem Promotionsausschuss
des Fachbereichs 2 (Biologie/Chemie)
der Universität Bremen

von

Chemie-Ingenieur (FH) **Alexej Kreider**

Bremen, November 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Andreas Hartwig	(Universität Bremen)
Zweitgutachter: Prof. Dr. Detlef Gabel	(Jacobs University Bremen)
Tag der Einreichung:	11.11.2013
Tag der öffentlichen Verteidigung:	16.01.2014

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe diese Dissertationsarbeit zuvor an keiner anderen Stelle eingereicht.

Bremen, 6. Februar 2014

Alexej Kreider

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Professor Dr. Andreas Hartwig* für die Themenstellung und für das Anfertigen des Erstgutachtens sowie dem Abteilungsleiter *Dr. Volkmar Stenzel* für die Aufnahme in die Abteilung Lacktechnik.

Weiterhin möchte ich *Dr. Ingo Grunwald* und *Dr. Stephan Sell* für die Betreuung meiner Dissertation danken, die sich in fachlichen Diskussionen und diversen Anregungen widerspiegelt. Außerdem danke ich *Dr. Ingo Grunwald* für die Unterstützung beim Schreiben von wissenschaftlichen Veröffentlichungen und für das Korrekturlesen dieser Dissertation.

Des Weiteren möchte ich den Kollagen und Kolleginnen der Abteilungen *OE 414 Klebstoffe und Polymerchemie* und *OE 415 Lacktechnik*, sowie dem gesamten Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung für die Unterstützung meiner Dissertation danken.

Weiterhin möchte ich mein Dank aussprechen an:

Yvonne Wilke für Einweisung in die lacktechnische Charakterisierungsmethoden.

Stefanie Kaprolat und *Dr. Jorg Ihde* für Atmosphären-Plasmabehandlung.

Jost Degenhardt für die Einweisung in die Kontaktwinkelmessung.

Dr. Madus Fenske und *Christian Tornow* für ToF - SIMS - und XPS - Messungen.

Dr. Martin Rütters, *Katja Marnitz* und *Manuela Stuve* für die Einweisung in die DSC.

Dr. Thomas Kowalik und *Dr. Kerstin Albinsky* für die Unterstützung in der Schwingungsspektroskopie und Elektronenspektroskopie.

Dr. Katharina Richter und *Linda Wittig* für Lichtmikroskopie und QCM-D-Messungen.

Andrea Gaede-Köhler für die Messung der thermischen Hysterese mittels Sonokristallisation.

Mein weiterer Dank gilt dem Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie dem Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung für die Finanzierung meiner Dissertation (BMBF - Förderkennzeichen 13N9788).

Außerdem möchte ich mich bei Herrn *Professor Dr. Detlef Gabel* für das Anfertigen des Zweitgutachtens bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei *meiner Familie*, sowie bei *meinen Eltern, Schwiegereltern, den lieben Nachbarn* und *meinen Freunden* für ihre Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	I
Danksagung	I
Abstract	1
Kurzzusammenfassung	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	5
2 Theoretischer Teil	7
2.1 Bionische funktionale Festkörperoberflächen	7
2.2 Immobilisierung von Proteinen an Festkörperoberflächen	9
2.2.1 Konformationsstabilisierende Kräfte der Proteine	10
2.2.2 Chemische und physikalische Eigenschaften der Festkörperoberflächen	13
2.3 Immobilisierungsmethoden von Proteinen an Festkörperoberflächen	15
2.3.1 Reaktivität der Aminosäuren bei einer spezifischen Immobilisierung	16
2.3.2 Immobilisierungsstrategien von Proteinen	18
2.3.3 Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid	18
2.3.4 Funktionalisierung der Festkörperoberfläche	19
2.3.5 Immobilisierung von HRP auf Polyurethanoberflächen.....	22
2.3.6 Spezifische Immobilisierung von HRP auf Goldoberflächen.....	27
2.4 Immobilisierte Proteine	28
2.4.1 Meerrettichperoxidase	28
2.4.2 Anti-Frost-Proteine und Anti-Frost-Protein Typ III	30
2.5 Schwingungsspektroskopie an Proteinen	32
2.5.1 Schwingungsspektroskopie an Proteinen in wässriger Lösung	32
2.5.2 Schwingungsspektroskopie von Proteinen auf Festkörperoberflächen	41
3 Experimenteller Teil	50
3.1 Materialien.....	50
3.2 Experimente mit Proteinen in Lösung.....	54
3.2.1 Messung der thermischen Hysterese mittels Sonokristallisation [154]	54
3.2.1.1 Kalibrierung der Messvorrichtung [154]	55
3.2.1.2 Untersuchung der Funktionswirkung des AFP	56
3.2.1.3 Untersuchung des pH- und des Temperatur-Einflusses.....	56

3.2.2 Messung der thermischen Hysterese mittels DSC	57
3.3 Experimente mit Proteine an Oberflächen.....	58
3.3.1 Spezifische Immobilisierung von HRP auf einer Polyurethanoberfläche	58
3.3.1.1 Präparation des PUR-Systems und O ₂ -Plasmaaktivierung	58
3.3.1.2 Präparation des PUR-PDMS-Hybrids und Druckluft-Plasmaaktivierung.....	58
3.3.1.3 Silanisierung mittels (3-Aminopropyl)trimethoxysilan.....	59
3.3.1.4 Immobilisierung von HRP unter Verwendung von Glutaraldehyd	60
3.3.1.5 Untersuchung der katalytischen Aktivität der immobilisierten HRP	60
3.3.2 Spezifische Immobilisierung von HRP auf der Goldoberfläche	61
3.3.2.1 Anbindung von (Mercaptopropyl)trimethoxysilan auf der Goldoberfläche	61
3.3.2.2 Anbindung von (Triethoxysilyl)undecanal	62
3.3.2.3 Immobilisierung von HRP und AFP Typ III	62
3.3.2.4 Untersuchung der Aktivität der immobilisierten HRP und AFP	62
3.3.2.5 Präparation und Untersuchung der Proteinadsorption mittels QCM-D.....	64
4 Messmethoden	67
4.1 Dynamische Differenzkalorimetrie	67
4.2 Schwingungsspektroskopie an Proteinen in Lösung	67
4.3 Röntgen-Photoelektronenspektroskopie.....	67
4.4 Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie	68
4.5 Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der Oberflächenenergie	68
4.6 Mithras LB-940 zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	68
4.7 PM-IRRA-Spektroskopie	69
4.8 ATR-IR-Spektroskopie.....	70
4.9 Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsmessung.....	71
4.10 Reifkammer für Reifformationsuntersuchungen	71
5 Ergebnisse und Diskussion	73
5.1 Untersuchung der Funktionswirkung des AFP Typ III	73
5.1.1 Kalibrierung der Sonokristallisation-Messvorrichtung [154]	73
5.1.2 Bestimmung der thermischen Hysterese [154].....	74
5.1.3 Untersuchung der thermischen Hysterese mittels DSC	78
5.1.4 Untersuchung des pH- und des Temperatureinflusses.....	84
5.1.4.1 Effekt der thermischen Denaturierung auf das AFP Typ III	84
5.1.4.2 Effekt des pH auf das AFP Typ III	88
5.2 Protein an Polyurethan- und Goldoberflächen	91

5.2.1 Immobilisierung von HRP auf der Polyurethanoberfläche.....	91
5.2.1.1 O ₂ -Plasmabehandlung der PUR-Oberfläche.....	91
5.2.1.2 Interpretation der Silanisierung der O ₂ -plasmabehandelten PUR-Oberfläche ...	93
5.2.1.3 PUR-PDMS-Systems und Plasmaaktivierung [214]	103
5.2.1.4 Pfropfung des Glutaraldehydes auf der PUR-Oberfläche.....	110
5.2.1.5 Untersuchung der katalytischen Aktivität der HRP [214]	112
5.2.2 Immobilisierung von HRP auf einer Goldoberfläche [220]	114
5.2.2.1 Untersuchung der Anbindung von (Mercaptopropyl)trimethoxysilan	114
5.2.2.2 Untersuchung der Anbindung von (Triethoxysilyl)undecanal	116
5.2.2.3 Untersuchung der katalytischen Aktivität der immobilisierten HRP	120
5.2.2.4 Auswertung der QCM-D-Experimente.....	125
5.2.3 Immobilisierung des AFP Typ III auf der Goldoberfläche.....	132
Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	139
Literaturverzeichnis	141
Publikationsliste.....	153
Lebenslauf.....	154

Abstract

In recent years anti-freeze proteins became the focus of interest for materials science due to their ice-crystall-growth inhibiting properties, recrystallisation properties and ice-crystall structuring properties. The transfer of these properties to surfaces by means of a molecular biomimetic approach is the challenge as well as motivation of this work. Here, the molecular bionic approach is based on chemical immobilization methods of proteins to solid surfaces. Thus, the first question of this work can be stated; upon the understanding interrelationships of the activity of immobilized and dissolved antifreeze protein type III (AFP type III). To obtain an answer to this question, the activity of AFP type III in case of its dissolved state was determined by sonocrystallisation, a newly developed measuring device, and differential scanning calorimetry. The activity of anti-freeze proteins on the surface was analyzed by conducting a rime test and a frost-adhesion test in the rime chamber. As solid surfaces acted in the present work a high-energy gold surface on the one hand and a low-energy polyurethane surface on the other hand. Due to the chemical inertness of the polyurethane surface compressed-air plasma activation was performed. The purpose of the atmospheric pressure plasma activation was to introduce the functional groups necessary for immobilization.

Generally, it is known from the literature that proteins in face boundaries, such as protein-water interface [1], [2], [3] and protein-solid interface [4], [5], [6], are subject to deconformation, also known as denaturation, due to intermolecular interactions. For this reason, the effect of the protein-solid interface on both, the conformation as well as the bioactivity, represents the most important aspect of this work. In this context, the second question of this study refers to understanding the relationships between the conformational change and the activity of proteins after immobilization. The effects of immobilization on the conformation have been successfully studied by vibrational spectroscopy using horseradish peroxidase and anti-freeze protein type III. To verify a possible correlation between surface-induced conformational change and activity of horseradish peroxidase, activity tests were performed on horseradish peroxidase-solid interphase using the colorless chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

Kurzzusammenfassung

In den letzten Jahren rückten Anti-Frost-Proteine aufgrund ihrer eiskristallwachstumshemmenden Eigenschaften, Rekristallisationseigenschaften sowie eiskristallstrukturierenden Eigenschaften in den Mittelpunkt des Interesses von Materialwissenschaftlern. Die Übertragung dieser Eigenschaften auf Oberflächen mittels eines molekular-bionischen Ansatzes stellt eine Herausforderung dar und ist die Motivation dieser Arbeit. Dabei beruht der molekular-bionische Ansatz auf chemischen Immobilisierungsmethoden von Proteinen an Festkörperoberflächen. Dazu lässt sich die erste Fragestellung dieser Arbeit über das Verständnis der Zusammenhänge der Aktivität des immobilisierten und des gelösten Anti-Frost-Proteins Typ III (AFP Typ III) formulieren. Um auf diese Fragestellung eine Antwort zu erlangen, wurde zur Bestimmung der Aktivität des AFP Typ III im Falle des gelösten Zustandes die neu entwickelte Sonokristallisation-Messvorrichtung und die Dynamische Differenzkalorimetrie eingesetzt. Die Aktivität der Anti-Frost-Proteine an der Oberfläche wurde durch die Durchführung eines Reiftests und eines Reif-Adhäsions-Test in der Vereisungskammer analysiert. Als Festkörperoberflächen fungierten in der vorliegenden Arbeit zum einen hochenergetische Gold- zum anderen niederenergetische Polyurethanoberflächen. Aufgrund der chemischen Inertheit der Polyurethanoberfläche wurde eine Atmosphärendruck-Plasmabehandlung durchgeführt. Der Zweck dieser Atmosphärendruck-Plasmabehandlung bestand darin, die für die Immobilisierung erforderlichen funktionellen Gruppen einzuführen.

Generell ist aus der Literatur bekannt, dass Proteine an verschiedenen Phasengrenzen, wie der Protein-Wasser-Interphase [1], [2], [3] oder der Protein-Festkörper-Interphase [4], [5], [6] einer Konformationsänderung aufgrund der intermolekularen Wechselwirkungen unterliegen. Aus diesem Grund stellt die Auswirkung der Protein-Festkörper-Interphasen sowohl auf die Konformation als auch auf die Aktivität der Proteine den wichtigsten Aspekt dieser Arbeit dar. In diesem Kontext bezieht sich die zweite Fragestellung auf das Verständnis der Zusammenhänge der Konformationsänderung und der Aktivität von Proteinen in Abhängigkeit von der Immobilisierung. Die Auswirkungen der Immobilisierungsmethoden auf die Konformation unter Verwendung der Meerrettichperoxidase und des Anti-Frost-Protein Typ III wurden erfolgreich mithilfe der Schwingungsspektroskopie untersucht. Um eine mögliche Korrelation zwischen oberflächeninduzierten Konformationsänderungen und der Aktivität der Meerrettichperoxidase zu überprüfen wurden Aktivitätstests unter Verwendung des farblosen Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin an Meerrettichperoxidase-Festkörper-Interphasen durchgeführt.

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atmosphärendruck
AFM	engl. <i>Atomic Force Microscopy</i>
AFP	engl. <i>Anti-Freeze-Proteins</i>
APTMS	(Aminopropyl)trimethoxysilan
ATR	engl. <i>Attenuated Total Reflection</i>
BE	engl. <i>Binding Energy</i>
CAG	engl. <i>Carrier-bound Active Groups</i>
CD	engl. <i>Circular Dichroism</i>
CIG	engl. <i>Carrier-bound Inert Groups</i>
DLDK	Dynamische Leistungs-Differenzkalorimetrie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	engl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EPR	engl. <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
FSD	engl. <i>Fourier-Self-Deconvolution</i>
GTA	Glutaraldehyd
HRP	engl. <i>Horseradish Peroxidase</i>
I _{AC}	engl. <i>Time-Independent Signal</i>
I _{DC}	engl. <i>Time-Dependent Signal</i>
IFAM	Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung
IR	Infrarot
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
LIA	engl. <i>Lock-in Amplifier</i>
MALDI-MS	engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry</i>
MCT	engl. <i>Mercury Cadmium Telluride</i>
MPTMS	(Mercaptopropyl)trimethoxysilan

NMA	N-Methylacetamid
NMR	engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OFE	freie O berflächen e nergie
OWRK	O wens, W endt, R abel und K aelble
PEM	P hotoelastischer M odulator
PLS	engl. <i>Partial-Least-Squares-methods</i>
PM	P olarisation- M odulation
PMA	engl. <i>Polarization Modulation Accessory</i>
PUR	P olyurethan
PUR-PDMS	P olyurethan- P oly(d iemethylsiloxan)
QCM-D	engl. <i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation</i>
SAM	engl. <i>Self-Assembled Monolayer</i>
S _N 2	bimolekulare n ucleophile S ubstitutionsreaktion
TEA	T riethylamin
TESU	(T riethoxysilyl) u ndecanal
TH	engl. <i>Thermal Hysteresis</i>
THz	T erahertz
TMB	3,5,3',5'- T etramethyl b enzidin
ToF-SIMS	engl. <i>Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
UV/Vis	U ltraviolett/ V isuell
VCD	engl. <i>Vibrational Circular Dichroism</i>
VDI	V erein D eutscher I ngenieur e
VUV	V akuum- U ltra- V iolette
XPS	engl. <i>X-ray photoelektron spectroscopy</i>
ZnSe	Z inkselinid

1 Einleitung

Proteine sind für biologische Prozesse unentbehrlich. Die Aufgaben der Proteine in Organismen sind mannigfaltig wie unzählig. Sie fungieren z. B. als biochemische Katalysatoren oder übernehmen als Faserproteine Gerüstfunktionen in den Organismen. Seit einigen Jahren rücken Proteine aufgrund ihrer herausragenden Eigenschaften in den Mittelpunkt des Interesses von Materialwissenschaftlern und werden zunehmend als Ausgangsstoffe zur Entwicklung innovativer Materialien wahrgenommen [7]. Das Augenmerk gilt dabei insbesondere bestimmten Proteinen wie z. B. katalytisch aktiven Enzymen, anti-mikrobiellen Peptiden und Anti-Frost-Proteinen als Vorbilder für bionische funktionale Festkörperoberflächen [8]. In der vorliegenden Dissertation wird bei der Generierung von bionischen funktionalen Festkörperoberflächen der Fokus auf das katalytisch aktive Enzym Meerrettichperoxidase und auf das Anti-Frost-Protein Typ III (AFP Typ III) mit seinen rekristallisationshemmender Funktionswirkung gelegt.

Die Generierung von bionischen funktionalen Festkörperoberflächen wird im Allgemeinen dem Forschungsgebiet „Protein-Festkörper-Interphasen“ zugeordnet. Dieses Forschungsgebiet setzt sich, unter anderem mit folgenden Fragen auseinander, wie z. B. eine Adsorption von Proteinen in Hinsicht der verschiedenen Wechselwirkungen an Festkörperoberflächen erfolgt und welche Auswirkungen Phasengrenzen auf die Proteinstruktur und auf die von der Proteinstruktur abhängige Aktivität haben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zum einen die Untersuchung der Funktionswirkung der Proteine in Lösung und zum anderen die Untersuchung der Übertragbarkeit der Proteine auf Trägeroberflächen durch Immobilisierungsmethoden. Als Trägeroberflächen für Proteine wurden eine niederenergetische Polyurethanoberfläche und eine hochenergetische Goldoberfläche verwendet. Während der Bearbeitung dieser Hauptaufgabe sind zwei Fragestellungen entstanden. Die erste Fragestellung dieser Dissertation richtet sich auf das Verständnis der Zusammenhänge der Aktivität des immobilisierten und des gelösten Anti-Frost-Protein Typ III. Die zweite Fragestellung dieser Dissertation bezieht sich auf das Verständnis der Zusammenhänge der Konformationsänderung und der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Meerrettichperoxidase innerhalb der beiden durchgeführten Immobilisierungsmethoden. Eine davon wird als spezifische Immobilisierungsmethode von Proteinen definiert. Diese Immobilisierungsmethode beruht auf chemischen Reaktionen der Proteinketten mit vernetzten funktionellen Schichten der Festkörperoberfläche (Abbildung 1-1 A). Diese funktionelle Schicht basiert auf Organosilanmonomeren. Die zweite betrachtete Immobilisierungsmethode auf einer starren Goldoberfläche oder reinen Polyurethanoberfläche wird im Rahmen dieser

mithilfe der Infrarot-Spektroskopie untersucht werden. In diesem Zusammenhang wird in dieser Arbeit eine Immobilisierungsstrategie auf der Goldoberfläche erarbeitet, welche solche Untersuchungsmöglichkeiten zulässt.

2 Theoretischer Teil

2.1 Bionische funktionale Festkörperoberflächen

Der Begriff Bionik im Sinne der VDI-Richtlinie 6221 bezeichnet die Verbindung zwischen Biologie und Technik mit dem Ziel durch Abstraktion, Übertragung und Anwendung von Erkenntnissen aus biologischen Vorbildern technische Problemstellungen zu lösen [8]. Seit etwa 1980 wird die Bionik aufgrund der rasanten Entwicklung neuer Methoden der Messtechnik und Fertigungstechnik auch auf die Mikro- und Nanoskala erweitert [11]. Dazu zählt im übertragenen Sinne auch das biologische Grenzflächensystem in der Mikro- und Nanoskala (Abbildung 2-1).

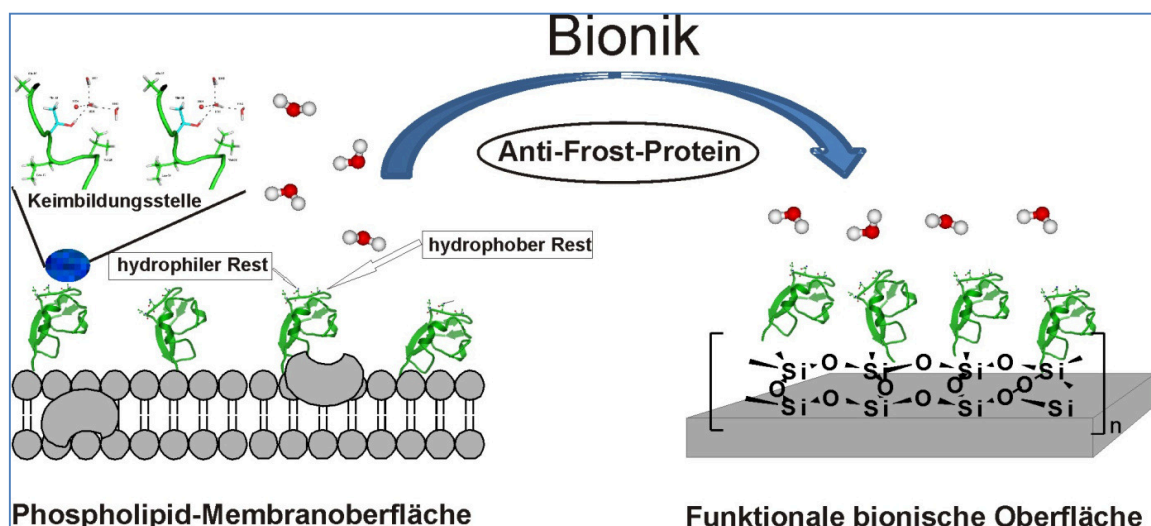


Abbildung 2-1: Vereinfachte Darstellung der Wirkungsweise der Anti-Frost-Proteine auf der äußeren Membranoberfläche [12], [13] (linke Seite) und des molekular-bionischen Ansatzes einer Immobilisierung der Anti-Frost-Proteine an Festkörperoberflächen (rechte Seite).

Aus diesen biologischen Grenzflächen lassen sich bionische Oberflächensysteme generieren. Hierunter versteht man nach der Richtlinie VDI 6221 solche Systeme [8], welche maßgeblich die biologische/bionische Funktion bestimmen. Zu diesen Systemen gehören vorwiegend katalytische und nicht-katalytische organische Biomoleküle. Zum einen sind dies Enzyme, die ihre biokatalytischen Eigenschaften in der Natur nutzen können, um z. B. Substanzen, die an die Oberfläche gelangen, zu oxidieren, zu reduzieren oder zu anderen Strukturen zu metabolisieren [8]. Zum anderen sind es spezielle Proteine, die zwar keine katalytischen Effekte aufweisen, aber aufgrund ihrer außergewöhnlichen physikochemischen Effekte Auf-

merksamkeit in der Bionik hervorrufen. Ein markantes Beispiel ist das spezielle Protein Hydrophobin, welches in der Technik als biologisches Hydrophobierungsmittel verwendet wird [14]. Weitere Beispiele für nicht-katalytische Effekte sind Peptide auf der Haut von Amphibien, die diese Tiere vor mikrobiellen Infektionen schützen, sowie Frostschutzproteine, auch Anti-Frost-Proteine genannt, welche ein Überleben von Organismen bei Temperaturen unterhalb von 0 °C ermöglichen. In diesem Zusammenhang stellen bionische Oberflächensysteme in der Oberflächentechnik einen enormen Ideenpool und ein Innovationspotenzial für technische Problemlösungen dar.

Im Rahmen dieser Dissertation wird besonderes Augenmerk auf Anti-Frost-Proteine, auch als eisstrukturierende Proteine bekannt, mit ihren biologischen Frostschutzeigenschaften, gelegt. Wie der Name dieser Biopolymerklasse impliziert, besteht ihre Wirkungsweise darin, das Wachsen der Eiskristalle zu hemmen oder zu inhibieren [15]. Diese Proteine werden von speziellen Genen in den Zellen synthetisiert und befinden sich an der äußeren Zellmembranoberfläche wie auch in der extrazellulären Körperflüssigkeit [12].

Dieses physikalische Phänomen der Anti-Frost-Proteine ermöglicht den lebensnotwendigen Stoffwechsel der Zelle, welcher ohne diese Funktionswirkung durch größere Eiskristalle oder geschlossene Eisschichten auf der Zellmembranoberfläche gestört oder sogar zum Erliegen kommen kann [12]. Infolgedessen gilt das beschriebene Modell aufgrund seiner Similarität zur Festkörperoberfläche als Vorbild für die Untersuchung des biomimetischen Ansatzes. In diesem Zusammenhang berichten Esser-Kahn et al. [16] über die erste Untersuchung dieses biomimetischen Ansatzes unter Verwendung von Anti-Frost-Proteinen bei der Herstellung des Polymer-Protein-Konjugats AFP-Protein-(2-hydroxypropylmethacrylamid)-Hybrid (AFP-HPMA) auf einer Glas-Oberfläche. Diese Studie zeigt eine gefrierhemmende Wirkung des Wasserfilms auf der AFP Typ III biofunktionalen Glas-Oberfläche (Abbildung 2-2).

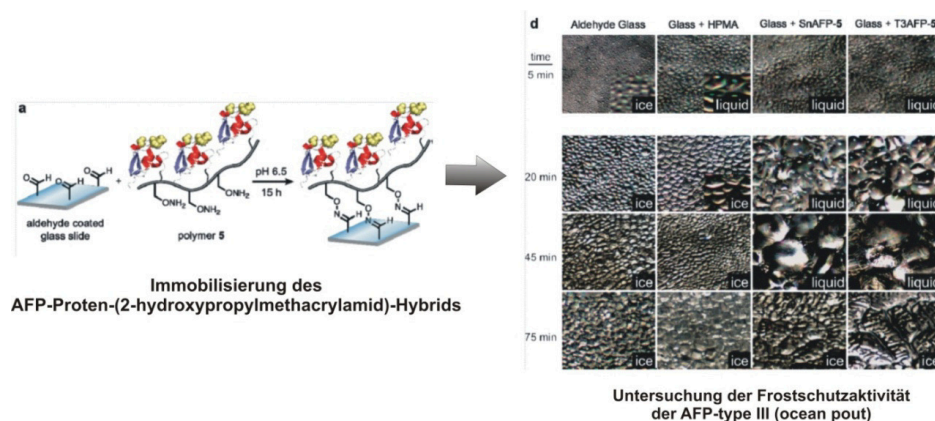


Abbildung 2-2: Darstellung der Immobilisierung des AFP Typ III und Auswertung des bionischen Oberflächensystems (abgewandelt von [16].)

Nicht selten geht die Immobilisierung von Biomolekülen an Festkörperoberflächen mit einer Konformationsänderung einher, verbunden mit einem Verlust der biofunktionalen Merkmale. Um diese Diskrepanz zwischen der Festkörperoberfläche und der Anfälligkeit der Biomoleküle besser verstehen zu können, wird in den nachfolgenden Unterkapiteln auf den komplexen Aufbau der Proteine und deren Einflüsse auf die Immobilisierung eingegangen.

2.2 Immobilisierung von Proteinen an Festkörperoberflächen

Im Allgemeinen gehört die Immobilisierung von Molekülen zu den Adsorptionsvorgängen, die unter Anlagerung gelöster oder gasförmiger Substanzen an einer Phasengrenzfläche erfolgen. Die Adsorption der Proteine an einer Phasengrenzfläche fest/flüssig stellt einen komplexen Vorgang dar. Zum einen, weil die Proteine vielfältige funktionelle Eigenschaften besitzen, die durch unterschiedliche funktionelle Aminosäure-Seitenketten bedingt sind. Und zum anderen, weil sie viele Faltungsmöglichkeiten besitzen.

Diese grundlegenden Eigenschaften der Proteine führen dazu, dass die Immobilisierung entweder spezifisch oder unspezifisch erfolgen kann. Unter einer spezifischen Immobilisierung versteht man eine Anbindung von Proteinen an spezifischen funktionellen Gruppen der Festkörperoberfläche, welche aus chemischer Sicht für eine Anbindung der Proteine geeignet sind. Unter einer unspezifischen Immobilisierung versteht man dagegen eine Proteinadsorption an reinen Festkörperoberflächen, ohne diese vorher mit funktionellen Gruppen ausgestattet zu haben. Die Adsorption der Proteine an Festkörperoberflächen wird dabei von nicht-kovalenten Wechselwirkungen, bei welchen eine Bindungsstärke von 1 - 350 kJ/mol wirksam ist, beeinflusst. Sowie von Wechselwirkungen, welche den kovalenten Bindungskräften von 200 - 500 kJ/mol gleichen [17]. Wobei kovalente Bindungen dabei nicht ausgeschlossen werden können.

Weiterhin weisen verschiedene Festkörperoberflächen aus mikroskopischer Sicht eine große Vielfalt an Strukturen auf, welche unterschiedliche Wechselwirkungskräfte auf die Adsorption der Proteine ausüben und dadurch die Struktur sowie die Aktivität der Proteine beeinflussen können. Während der Adsorption verhalten sich Proteine in der Regel als dynamische Teilchen, welche auf der Oberfläche entweder adsorbieren oder von der Oberfläche desorbieren können.

Die allgemeine Theorie zur thermodynamischen Beschreibung der Adsorptionsprozesse wurde zum ersten Mal von Irving Langmuir in Anlehnung an die Adsorption von Gasmolekülen an Oberflächen entwickelt, welche heutzutage als allgemeine Langmuir-Adsorptions-

isotherme bekannt ist [18]. Diese Theorie gilt als Standardwerk für die Entwicklung von theoretischen Beschreibungen der Proteinadsorption.

Ausmaß und Art der Adsorption von Biomakromolekülen hängen von mehreren Faktoren ab [18]:

- von der chemischen Natur des zu adsorbierenden Stoffes (Protein als Adhäsiv)
- von der chemischen Natur und der Oberflächenentwicklung des Adsorbens (Festkörper als Adhärens)
- von den Immobilisierungsumgebungsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Immobilisierungsmediums.

Nachfolgend soll zum einen die chemische Natur des zu adsorbierenden Proteins mit seinen grundlegenden Faltungsmöglichkeiten erläutert werden. Dies erfolgt unter der Berücksichtigung der konformationsstabilisierenden Kräfte sowie deren Einflüsse auf die Adsorption. Zum anderen soll anschließend die Oberflächenchemie betrachtet werden, um mögliche Auswirkungen der unspezifischen Immobilisierung auf die Biomakromoleküle entsprechend interpretieren zu können.

2.2.1 Konformationsstabilisierende Kräfte der Proteine

Um adhäsive Triebkräfte bei der Immobilisierung von der Seite der Proteine besser verstehen zu können, soll an dieser Stelle ein einführender Einblick in den komplexen Proteinaufbau und die nicht-kovalenten stabilisierenden Kräfte von Proteinen in einer wässrigen Lösung gewährt werden. Die Kenntnis dieser Kräfte hilft direkt, das Verhalten der Proteine an der Grenzfläche (fest/flüssig) zu verstehen [19].

Proteine sind natürliche, in der Länge variierende Copolymere, die aus 21 verschiedenen Bausteinen, den L- α -Aminosäuren und Iminosäuren aufgebaut sind. Diese 21 natürlichen Aminosäuren lassen sich grundsätzlich nach funktionellen Gesichtspunkten in drei Gruppen unterteilen [20]:

- Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten
- Aminosäuren mit polaren geladenen Seitenketten
- Aminosäuren mit polaren ungeladenen Seitenketten

Die Polarität der Seitenketten hat einen direkten Einfluss auf die Proteineadsorption.

Der Proteinaufbau erfolgt indem Aminosäuren über ihre Amino- und Carboxygruppen unter Wasseraustritt kondensieren und eine Peptidbindung bilden. Die Folge der über diese Peptidbindung verbundenen Aminosäuren ist das Bauprinzip der Aminosäuresequenz (Pri-

märstruktur). Die Raumstruktur der Proteine (Konformation) wird durch die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur beschrieben. Die Konformation stellt die Grundlage der Proteinfunktion dar und wird durch verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungskräfte sichergestellt (Abbildung 2-3). Zu diesen nicht-kovalenten Bindungen gehören z. B. hydrophobe Bindungen (hydrophober Effekt), elektrostatische Bindungen, Dipolkräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Bindungen. Die Unterschiede der nicht-kovalenten Wechselwirkungskräfte liegen in ihrer Bindungsstärke und sind in Abbildung 2-3 wiedergegeben.

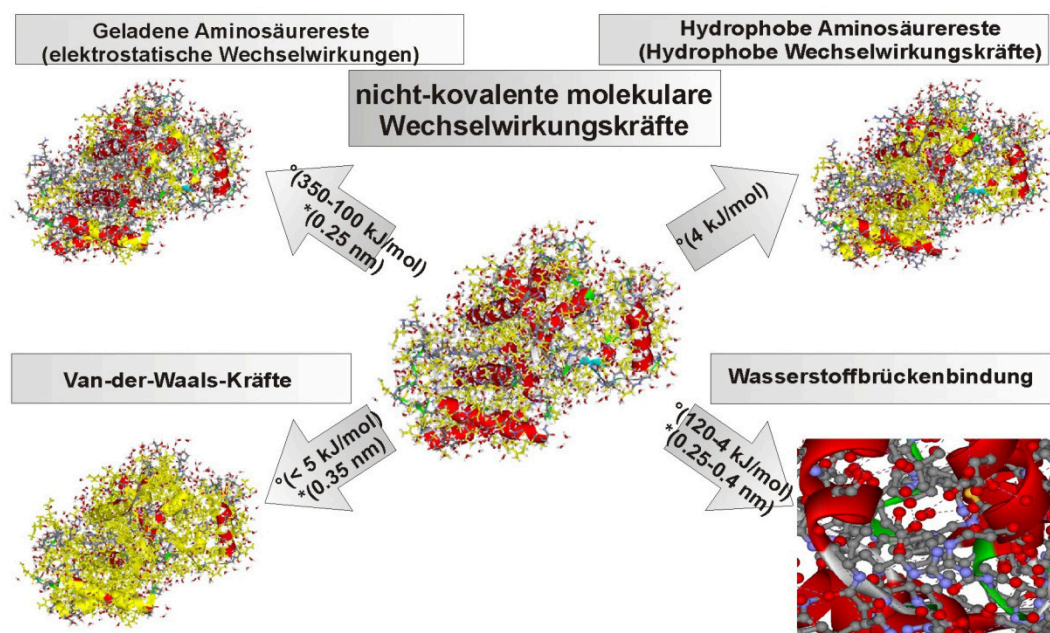


Abbildung 2-3: Ungefähre intermolekulare nicht-kovalente Kräfte in der HRP (\circ =Bindungsenergie [21] \ast =Bindungslänge [22]) (Modellierung mittels DS ViewerPro 5.0).

Im Allgemeinen liegt die Faltungsstabilität eines ungefalteten gelösten Proteins unter physiologischen Bedingungen im Bereich zwischen +40 und +60 kJ/mol [23], was, wie oben erwähnt, auf vielen Arten von Wechselwirkungen, vor allem auf nicht-kovalenten Wechselwirkungskräften, beruht. Demzufolge lassen sich Biomoleküle als ein dynamisches und sensibles System definieren, welches auf kleinste Veränderungen, z. B. Veränderungen des pH-Werts, der Puffer-Salzkonzentration, der Proteinkonzentration oder der Temperatur mit Konformationsänderung reagieren.

Diese relativ schwachen nicht-kovalenten Wechselwirkungskräfte, wie z. B. hydrophobe Wechselwirkungskräfte mit 4 kJ/mol oder van-der-Waals Kräfte < 5 kJ/mol, können daher durch oberflächeninduzierte Wechselwirkungen leicht aufgehoben werden, was zu einer Denaturierung der Proteine führen kann. In Bezug auf den hydrophoben Effekt berichteten Kauzmann et al. [24] als erste über die Bedeutung des hydrophoben Effektes für die Protein-

faltung und die Stabilität des Proteins. Dieser Effekt basiert auf starken intermolekularen Anziehungskräften zwischen unpolaren Seitenketten des Proteins. Bei dieser intermolekularen Interaktion bringen sich die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren durch Verdrängung von Wassermolekülen mit Entropiegewinn und unter Ausbildung von Aggregationen in einen energieärmeren und damit stabileren Zustand. Wie stark aber die Seitenkette einer Aminosäure in dem Protein vom Wasser verdrängt wird, hängt vom Hydrophobizitätsindex ab. Dieser Index, der den hydrophoben Charakter einer Aminosäure widerspiegelt, wurde von Tanford et al. [25] definiert. Die verschiedenen Hydrophobizitäten zwingen die Seitenketten der Aminosäuren dazu, starke Bindungen (ca. 4 kJ/mol) [26] untereinander einzugehen, welche zur Stabilisierung der biologischen Struktur führen. Umgekehrt können diese hydrophoben Aminosäure-Seitenketten bei sehr kleinen Distanzen zur hydrophoben Oberfläche aber auch dazu führen, dass der stabilisierte Proteinkern aufgrund dieser intramolekularen Interaktion mit der hydrophoben Spezies destabilisiert wird.

Einen weiteren Beitrag zur Proteinstabilisierung liefert die Ionenbindung, welche in der Literatur auch unter den Begriffen Elektrovalenz, Heterovalenz oder heteropolare Bindung zu finden ist. Die Ionenbindung kann mit Bindungsenergien von 100 - 350 kJ/mol stark sein und basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen entgegengesetzt geladenen funktionellen Gruppen wie z. B. COO^- und NH_3^+ [17]. Diese Ionenbindung eines Proteins kann durch die Dielektrizitätskonstante eines Lösungsmittels stark beeinflusst werden.

In derselben Weise, in der sich die vorgestellten entgegengesetzt geladenen Aminosäuren der Proteine untereinander oder mit der geladenen Festkörperoberfläche anziehen, können sich auch Ionen und Moleküle mit permanentem Dipolmoment μ anziehen.

Zuletzt sind noch starke Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Bindungsenergie von 4 - 120 kJ/mol zu nennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen erfüllen spezifische Eigenschaften in der Struktur und Funktion von biologischen Molekülen und sind verantwortlich für die Stabilisierung von Sekundärstrukturelementen wie α -Helix [27], β -Faltblatt [28] und *random coil* sowie der Tertiärstruktur und Quartärstruktur. Sie treten beim Kontakt zwischen Donatoren (NH_2 , OH) und Akzeptorgruppen (C=O) auf und können demzufolge ebenfalls mit den polaren Festkörperoberflächen ausgebildet werden.

Aus dieser Ausführung der möglichen nicht-kovalenten, zwischenmolekularen Kräfte der Proteinen ist zu erkennen, dass diese Vielfalt an Wechselwirkungen nicht nur für den Zusammenhalt der Moleküle zuständig ist, sondern auch großen Einfluss auf die Haftung der Proteine auf verschiedenen Materialien (Adhäsion) hat, was die Komplexität des Adsorptionsverhaltens der Proteine an Grenzflächen (fest/flüssig) erklärt. In der Oberflächenchemie

beschreibt das Wort Adhäsion die Vorgänge, die zur Haftung zwischen flüssigen und festen bzw. zwischen festen Phasen führen [29].

2.2.2 Chemische und physikalische Eigenschaften der Festkörperoberflächen

Generell müssen Festkörperoberflächen physikalisch oder chemisch modifiziert werden, um für eine spezifische Immobilisierung geeignet zu sein. Vor einer physikalischen oder chemischen Oberflächenmodifizierung müssen Eigenschaften der Festkörperoberfläche wie die Oberflächenpolarität, die Ladung und morphologische Eigenschaften (Rauheit und Topographie), im Vorfeld berücksichtigt werden (Abbildung 2-4). Die Oberfläche kann im mikroskopischen wie auch im makroskopischen Maßstab unterschiedliche Wechselwirkungen mit den adsorbierten Proteinen eingehen und auch deren Konformation beeinflussen. Aus diesem Grund ist es wichtig, in diesem Unterkapitel auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Festkörperoberflächen einzugehen.

Als erstes sollen Faktoren berücksichtigt werden, die die Eigenschaften der Festkörperoberflächen stark beeinflussen. Ein solcher Faktor ist die Dielektrizitätskonstante. In der Regel hat die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels nicht nur Einfluss auf das elektrostatische Potenzial des Proteins, sondern auch auf den funktionellen Charakter der Festkörperoberfläche. In diesem Zusammenhang geht aus mehreren experimentellen Arbeiten hervor, dass das Adsorptionsverhalten der Proteine von elektrostatischen Wechselwirkungen untereinander in der Volumenphase (Bulkphase) untereinander und an der Grenzfläche (fest/flüssig) abhängig ist [4], [30].

Die Proteine werden durch elektrostatische Kräfte, die von Ladungen und Partialladungen an der Oberfläche ausgehen, an die Festkörperoberflächen herangezogen. Der Ladezustand der Moleküle (Aminosäuren, Peptide und Proteine) wird in der Regel durch den pH-Wert der sie umgebenden Lösung beeinflusst.

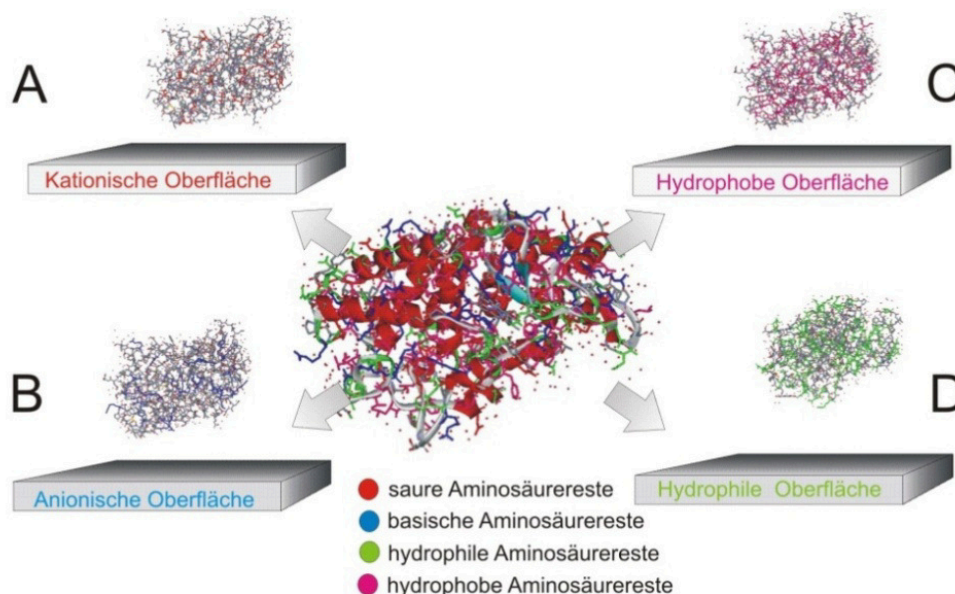


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der vier möglichen Wechselwirkungsszenarien zwischen Festkörperoberflächen und Proteinen: elektrostatische (A-B), hydrophobe (C), hydrophile (D) intramolekulare Wechselwirkungen (Donator-Akzeptor-Wechselwirkungen zwischen Proteinen und nativen Oxiden).

Es wird jedoch in mehreren Studien beschrieben, dass amphotere Polyelektrolyte einen anderen Ladungszustand in der Nähe einer geladenen Oberfläche als in der Volumenphase annehmen können [31]. So ist der Ladungszustand der ionisierbaren Gruppen der Proteine von ihrer lokalen elektrostatischen Umgebung direkt abhängig und kann dementsprechend die Immobilisierung sowie die Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen.

Eine weitere wichtige treibende Kraft für die Adsorption der Proteine ist die hydrophobe Wechselwirkung mit der Festkörperoberfläche. Allgemein leisten die hydrophoben Eigenschaften den höchsten Beitrag zur Proteinadsorption im Vergleich zu den elektrostatischen und hängen von der Oberflächenpolarität ab [32]. In diesem Zusammenhang haben Herrwerth et al. [33] bei der Untersuchung der Resistenz gegen Proteinadsorption bei oligoetherbasierten selbstorganisierten Monoschichten (SAM, engl. *Self Assembled Monolayer*) mit Faktoren wie interne Hydrophilie, terminale Hydrophilie und laterale Dichte der SAM-Schicht gezeigt, dass eine steigende Hydrophobie der Oligo(ethylenglykol)-Schicht aufgrund der eingeführten hydrophoben Endgruppen die Adsorption des Proteins Fibrinogen steigern. Weiterhin haben sie zeigen können, dass nicht nur die Terminierung der funktionellen Gruppen (polare oder unpolare Gruppen) die Adsorption der Proteine beeinflussen kann, sondern auch die Hydrophilie der internen funktionellen Einheiten und die Ordnung der SAMs wichtigere Faktoren bei der Proteinadsorption darstellen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Immobilisierung von folgenden Parametern abhängig ist: der physikalischen Natur des Trägers (z. B. Porosität, Form etc.); der chemischen Natur des Trägers (chemische Zusammensetzung); der Natur der Verknüpfung oder der Bindungschemie; der Konformation des Proteins während der Immobilisierung und nach der Immobilisierung; der Art und Länge des Abstandshalters; den Eigenschaften des Mediums während der Anknüpfung des ausgewählten Proteins; den individuellen Eigenschaften des ausgewählten Proteins; der Anzahl der Bindungen zwischen dem Protein und dem Träger und der Verteilung des Proteins auf oder in dem Träger [34]. Aus mehreren Studien geht hervor, dass aus den Protein-Festkörper-Interphasen-Wechselwirkungen meist ein Verlust der Sekundärstruktur der Proteine resultiert [4], [6], [35], welcher in den meisten Fällen zum Verlust der funktionellen Eigenschaften des Proteins in der Protein-Substrat-Interphase führt [4], [36], [37].

2.3 Immobilisierungsmethoden von Proteinen an Festkörperoberflächen

Unter einer Immobilisierung versteht man eine Fixierung von Proteinen unter teilweiser oder vollständiger Reduzierung der Proteinbeweglichkeit an Festkörperoberflächen. Die Verfahren der Immobilisierung der Proteine fassten Klibanov et al. [38], in fünf Gruppen zusammen: kovalente Bindung an festen Trägern, Adsorption an festen Trägern, Einschluss in die Polymermatrix, intermolekulare Vernetzung und Verkapselung. Die Immobilisierungsmethoden der Proteine können auch noch nach verschiedenen chemischen und physikalischen Prinzipien klassifiziert werden wie: 1) Befestigung am Träger, 2) Vernetzung, 3) Einschluss und Verkapselung (Abbildung 2-5) [39], [40], wobei für diese Arbeit die Befestigung an Trägern relevant ist.

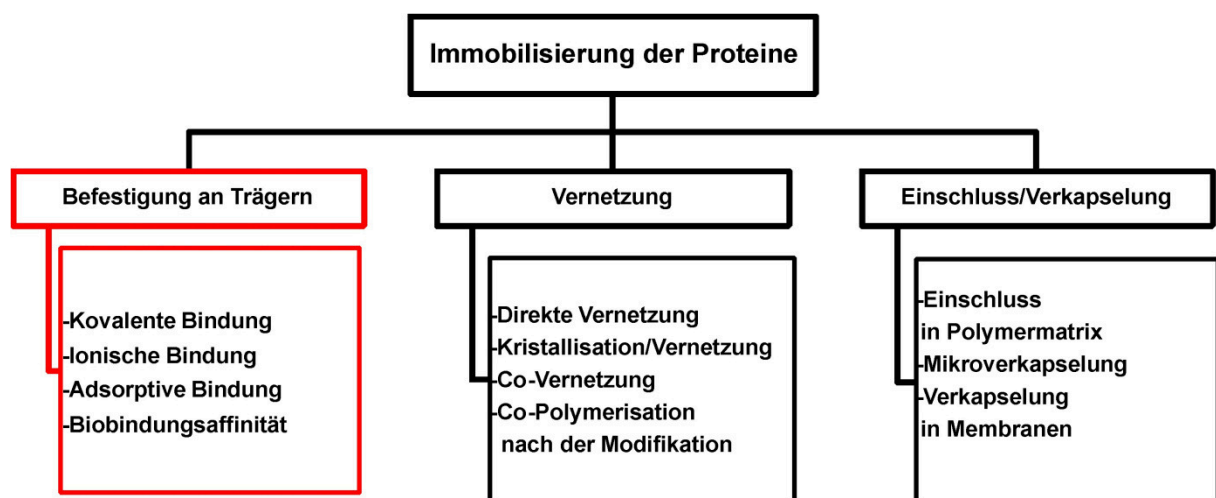


Abbildung 2-5: Klassifizierung der Immobilisierungsmethoden nach [40].

Bei einer spezifischen Proteinimmobilisierungsmethode sind chemische Reaktionen (B) zwischen aktiven funktionellen Aminosäure-Seitengruppen (A) und aktiven Funktionalitäten (C) notwendig (CAG, engl. Carrier-Bound Active Groups), welche sich neben den inerten funktionellen Gruppen (D) (CIG, engl. Carrier-Bound Inert Groups) auf den Festkörperoberflächen befinden (Abbildung 2-6). Eine spezifische Immobilisierung wird als Verbund aus den Festkörperoberflächen, Abstandshaltern und dem zu immobilisierenden Protein betrachtet.

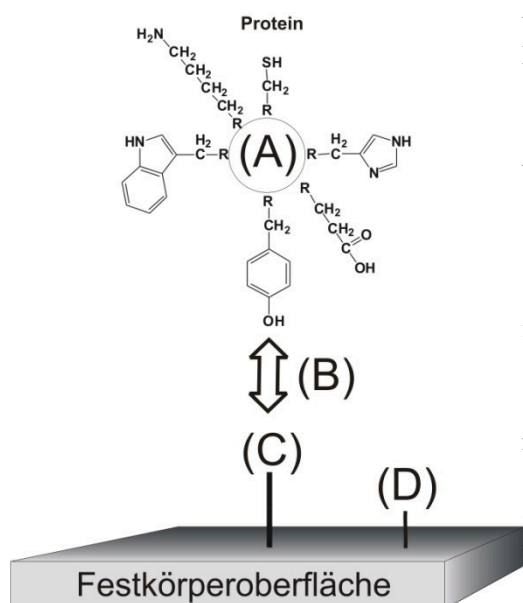


Abbildung 2-6: Schema der spezifischen Immobilisierung der Proteine an einer Festkörperoberfläche [34].

Aminosäure des Proteins und deren reagierende funktionelle Seitengruppen (A).

Chemische Reaktion zwischen Aminosäure-Seitengruppen und den Quervernetzungsreagenzien (oder den funktionellen Gruppen der Festkörperoberfläche) (B).

Funktionalisierung der Festkörperoberfläche zur Immobilisierung der Proteine (C).

Einflüsse der inerten funktionellen Gruppen bei der Immobilisierung (D).

Die Reaktivität der Proteine hängt in der Regel von der Reaktivität der Aminosäure-Seitenketten des Proteins an dessen Oberfläche ab. Studien haben ergeben, dass nur wenige Aminosäure-Seitenketten wirklich reaktiv gegenüber funktionellen Gruppen auf der Festkörperoberfläche sind. In diesem Kontext wird im folgenden Abschnitt auf die Reaktivität und die Aktivierung der Aminosäure-Seitenketten eingegangen.

2.3.1 Reaktivität der Aminosäuren bei einer spezifischen Immobilisierung

Aminosäuren enthalten außer den beiden funktionellen Gruppen -NH_2 (bzw. NH_3^+) und -COOH (bzw. COO^-), die für das Ausbilden einer Peptidbindung verantwortlich sind, Seitengruppen, welche auch als funktionelle Gruppen fungieren und in drei Gruppen eingeteilt werden.

Zu der ersten Gruppe gehören unpolare Aminosäuren mit aliphatischen Seitengruppen wie Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin und Prolin, welche für Immobilisierungszwecke chemisch inert sind. Zu der zweiten Gruppe von Aminosäuren gehören Asparagin, Glutamin, Threonin und Serin, welche relativ polare Bestandteile enthalten und somit einen besonders

hydrophilen Charakter zeigen. Diese Aminosäuren befinden sich in hydrophilen Bereichen eines Proteinmoleküls, insbesondere an der oder nahe der Proteinoberfläche und sind für die Hydratation in der wässrigen Umgebung verantwortlich [41]. In diesem Zusammenhang können aliphatische Hydroxylgruppen des Serins und des Threonins bei einer Hydratation als Wasser-Derivate angesehen werden, welche eine geringere Reaktivität gegenüber nukleophilen Reaktionen zeigen [40]. Durch diese systematische Einteilung der Aminosäuren stehen nun neun Aminosäuren mit ihren im Folgenden dargestellten ionisierbaren Seitenketten für Modifikations- und Konjugationszwecke zur Verfügung [40]. Zu dieser dritten Gruppe gehören die Guanidinogruppe des Arginins, die γ - und β -Carboxylgruppe der Glutaminsäure und der Asparaginsäure, die Sulfhydrylgruppe des Cysteins, die Imidazolgruppe des Histidins, die Indolylgruppe des Tryptophans, die phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosins und zuletzt die ϵ -Aminogruppe des Lysins [40].

In unprotoniertem Zustand kann jede dieser Seitenketten starke nukleophile Additionsreaktionen und insbesondere nukleophile Substitutionsreaktionen nach einem $\text{S}_\text{N}2$ -Mechanismus eingehen und somit für die meisten Proteinmodifikationsreaktionen und Kupplungsreaktionen von großem Nutzen sein [40]. Nach der Theorie der Nukleophilie kann die relative Größenordnung der nukleophilen Hauptgruppen in biologischen Molekülen wie folgt zusammengefasst werden: $\text{R-S}^- > \text{R-SH}$, $\text{R-NH}_2 > \text{R-NH}_3^+$, $\text{R-COO}^- > \text{R-COOH}$, $\text{R-O}^- > \text{R-OH}$ und schließlich $\text{R-S}^- > \text{R-NH}_2 > \text{R-COO}^- = \text{R-O}^-$ [42]. Mit diesen Beziehungen ist es offensichtlich, dass das stärkste Nukleophil in Proteinen die Thiolgruppe des Cysteins im ionisierten Zustand (Thiolat-Anion) ist. Daher stellt die chemische Reaktivität einer ionisierbaren Aminosäure-Seitengruppe grundsätzlich eine Funktion der Nukleophilie der Aminosäure-Seitenketten dar.

Jede Art von ionisierbaren Gruppen in Proteinen weist einen einzigartigen pK_s -Wert auf, welcher auf dem theoretischen Wert der Aminosäure basiert und durch das umgebende Milieu bestimmt wird [41]. Das ϵ -Amin des Lysins mit seinem pK_s -Wert hat im Vergleich zum α -Amin einen etwas höheren Ionisierungspunkt (pK_s von 9,3 - 9,5 gegenüber $\text{pK}_\text{s} = 10,0 - 10,2$ beim α -Amin). Bei pH-Werten kleiner als der pK_s -Wert dieser Gruppe werden die Amine protoniert und besitzen somit eine positive Ladung. Bei pH-Werten größer als der pK_s -Wert liegen die ϵ -Amine unprotoniert vor und tragen somit keine Nettoladung. Dieser unprotonierte Zustand der ϵ -Aminogruppen weist eine hohe Nukleophilie auf, so dass Reaktionen wie Acylierung, Alkylierung und zuletzt nukleophile Addition unter Ausbildung des sekundären Amins über den Verlauf einer reduktiven Aminierung möglich sind.

2.3.2 Immobilisierungsstrategien von Proteinen

Zur Immobilisierung der Proteine an Festkörperoberflächen stehen derzeit Dutzende Strategien zur Verfügung. Diese Synthesestrategien werden in fünf häufigste Reaktionstypen eingeteilt: Reaktionen der Aminogruppen von Aminosäuren wie Lysin mit Aldehydgruppen des Trägers unter Ausbildung einer Schiff'schen Base und anschließende reduktive Aminierung; Azokupplungsreaktion zwischen aktivierten Aromaten von Aminosäuren wie Thyrosin und Diazo-Komponenten des Trägers sowie Ringöffnungsreaktionen zwischen der Epoxidgruppe des Trägers und der primären Aminogruppe von Aminosäuren wie Lysin [34], [43]. In dieser Arbeit wird die Immobilisierungsstrategie für Proteine an Festkörperoberflächen angewandt, die auf der nukleophilen Additionsreaktion unter Ausbildung einer Schiff'schen Base und anschließender reduktiven Aminierung unter Ausbildung einer sekundären Aminogruppe beruht.

Unter einer reduktiven Aminierung versteht man die Hydrierung von Aldehyden und Ketonen in Gegenwart von Ammoniak oder primären oder sekundären Aminen unter Ausbildung von entsprechenden primären, sekundären oder tertiären Aminen [44], [45]. Eine reduktive Aminierung erfolgt in zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt erfolgt eine nukleophile Additionsreaktion desamins mit der Carbonylgruppe mit anschließender Kondensationsreaktion. Dabei resultiert ein Carbinolamin (Halbaminal), welches in einem zweiten Schritt durch Hydrierung unter Nutzung des Metallhydridkomplexes Natriumcyanoborhydrid zum entsprechenden Amin reduziert wird [46], [45]. Die theoretische Betrachtungsweise dieses Reaktionsverlaufs in der Volumenphase wird auch bei der Immobilisierungsschemie der Proteine an Festkörperoberflächen beibehalten.

2.3.3 Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid

In der Literatur ist die Instabilität der ausgebildeten Imingruppe, welche im Falle der Reaktion zwischen primären Aminen und Carbonylverbindungen eine Schiff'sche Base bildet, bekannt [47]. Aus diesem Grund wird bei der Immobilisierungsstrategie von Proteinen, welche auf der Chemie der Ausbildung der Schiff'schen Base beruht, die Imingruppe durch eine katalytische Reduktion zu einer stabileren sekundären Aminogruppe umgewandelt. Die Reduktion zum Produktamin kann dabei auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen:

- Übertragung der Hydridionen durch N-Nukleophile des aus einem Carbenium-Immonium-Kation entstehenden Vorreaktionsprodukts [44]
- Katalytische Hydrierung des gebildeten Carbinolamins mit elementarem Wasserstoff [44]

Für die Hydridübertragung können somit Metallhydridkomplexe wie Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4), Natriumborhydrid (NaBH_4), Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH_3), oder Ameisensäure (Leukart-Wallach-Reaktion) [44] zur Reduktion eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid eingesetzt, da dieses im Gegensatz zu Natriumborhydrid eine geringere Nukleophilie besitzt und somit nicht in der Lage ist, bei einem $\text{pH} > 5$ Ketone und Aldehyde zu reduzieren [44]. Außerdem berichten Borch et al. [48] über eine besondere Selektivität der reduktiven Aminierung unter Verwendung des Natriumcyanoborhydrids gegenüber Aldehyden und Ketonen. Des Weiteren haben Peng et al. [49] beobachten können, dass bei einer Immobilisierung von Antikörpern auf einem aldehydfunktionalisierten Träger unter Ausbildung der Schiff'schen Base und nach anschließender reduktiver Aminierung mittels Natriumcyanoborhydrid eine bessere immunologische Aktivität der monoklonalen Antikörper mindestens um das Fünffache im Vergleich zu Natriumborhydrid nachgewiesen werden kann.

2.3.4 Funktionalisierung der Festkörperoberfläche

Die Funktionalisierung der Festkörperoberfläche, die für eine anschließende Immobilisierung der Proteine unerlässlich ist, basiert auf chemischen und physikalischen Methoden, welche von den Eigenschaften der Festkörperoberfläche abhängen. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Festkörperfunktionalisierung durch die Silanisierung. Bei einer Silanisierung werden siliziumorganische Trialkoxysilanmonomere eingesetzt. Diese Organosilane beinhalten in ihrer Struktur eine Silizium-Alkoxyfunktion sowie einen über eine C_3 -Alkylgruppe gebundenen funktionellen organischen Substituenten als Kopfgruppe. Dieser Aufbau des Moleküls bringt eine Bifunktionalität des Moleküls mit sich und kann durch einen Austausch der Alkoxygruppen über eine Hydrolyse-/Kondensationsreaktion eine ionische Bindung mit oxidischen Hydroxid-Oberflächen ausbilden.

Seit dem ersten Bericht über einen erfolgreichen Einsatz von Trialkoxysilanen bei der Immobilisierung von Proteinen in der Arbeit von Weetall [50] unter Verwendung des 3-Aminopropyltriethoxysilans sind siliziumorganische Organosilanmonomere aus der Biotechnologie nicht mehr wegzudenken und stellen eine mit am häufigsten verwendete Immobilisierungsstrategie von Proteinen an anorganischen Festkörperoberflächen dar [51].

Die Trialkoxysilanmonomere weisen folgenden, in der Abbildung 2-7 A dargestellten, tetraedrischen Strukturaufbau $(\text{RO})_3\text{SiX}$ auf und bestehen aus organischer (X) und anorganischer Struktur (OR).

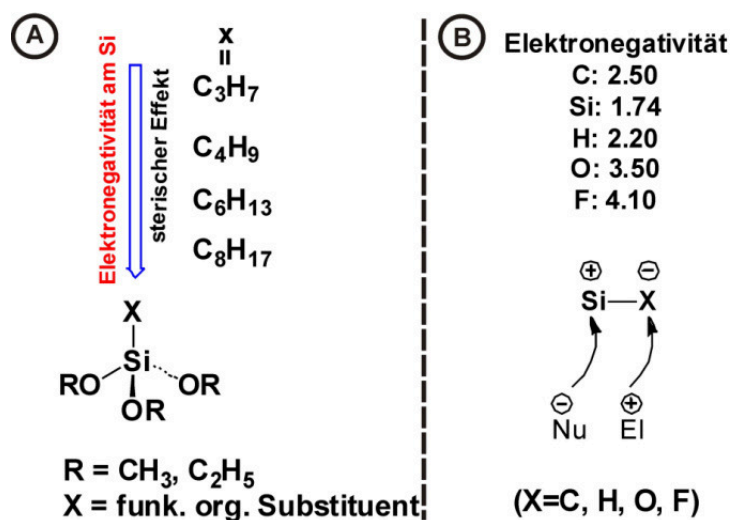


Abbildung 2-7: Allgemeine Struktur des Trialkoxysilans (A). Mögliche Reaktionsstellen für polare Reaktionstypen (B).

Die Bindung der organischen Struktur des Trialkoxysilans über eine Si-C Bindung hat eine hohe thermodynamische Stabilität und ist hydrolysestabil mit Bindungsenergien von ~300 kJ/mol, während die anorganische Struktur des Trialkoxysilans – meist Methoxy- oder Ethoxygruppen (Si-O-Bindung) – hydrolysierbar ist. Des Weiteren hat die anorganische Struktur mit einer Elektronegativitätsdifferenz von 1,7 einen ionischen Bindungsanteil und einen polaren Charakter. Aufgrund dieser Polarität können an der Si-O-Bindung zwei Additionsreaktionen formuliert werden. Zunächst eine nukleophile Additionsreaktion am Siliziumatom unter basischen Reaktionsbedingungen oder eine elektrophile Additions-Protonierungsreaktion am Sauerstoffatom unter sauren Reaktionsbedingungen (Abbildung 2-7 B).

Die allgemeine Anbindungsreaktion der Organosilane an anorganische Substrate ist in der Abbildung 2-8 dargestellt und verläuft in der Regel in zwei verschiedenen Phasen: in der Volumenphase (I), vor der Abscheidung der Organosilane, und an der Festphase (II). Wobei in den beiden Phasen die zwei Reaktionstypen Hydrolyse- und Kondensationsreaktion gleichzeitig nebeneinander stattfinden.

Die Abbildung 2-8 gibt eine mögliche Situationsreaktion während der Verankerung der Trialkoxysilanmonomere an der Festkörperoberfläche wieder. Abbildung 2-8 (I) zeigt, dass die bei der Hydrolysereaktion erzeugten reaktiven und metastabilen Silanolgruppen nicht nur mit der hydroxylierten Festkörperoberfläche zu Siloxanen kondensieren können, sondern auch Oligomerisationsprodukte in der Volumenphase bilden können. Wobei der Oligomerisationsgrad die Affinität des Alkoxysilans zu festen Oberfläche verschlechtern kann. In diesem Zusammenhang berichten Beari et al. [52] über eine Untersuchung der Hydrolyse

organofunktioneller Trialkoxysilane mittels ^1H - und ^{29}Si -NMR-Spektroskopie. Diese Untersuchungen zeigen, dass teilhydrolysierte Silanole kondensieren und somit bereits vor einer Verknüpfung mit der Oberfläche Oligomerisationsprodukte in der Volumenphase bilden.

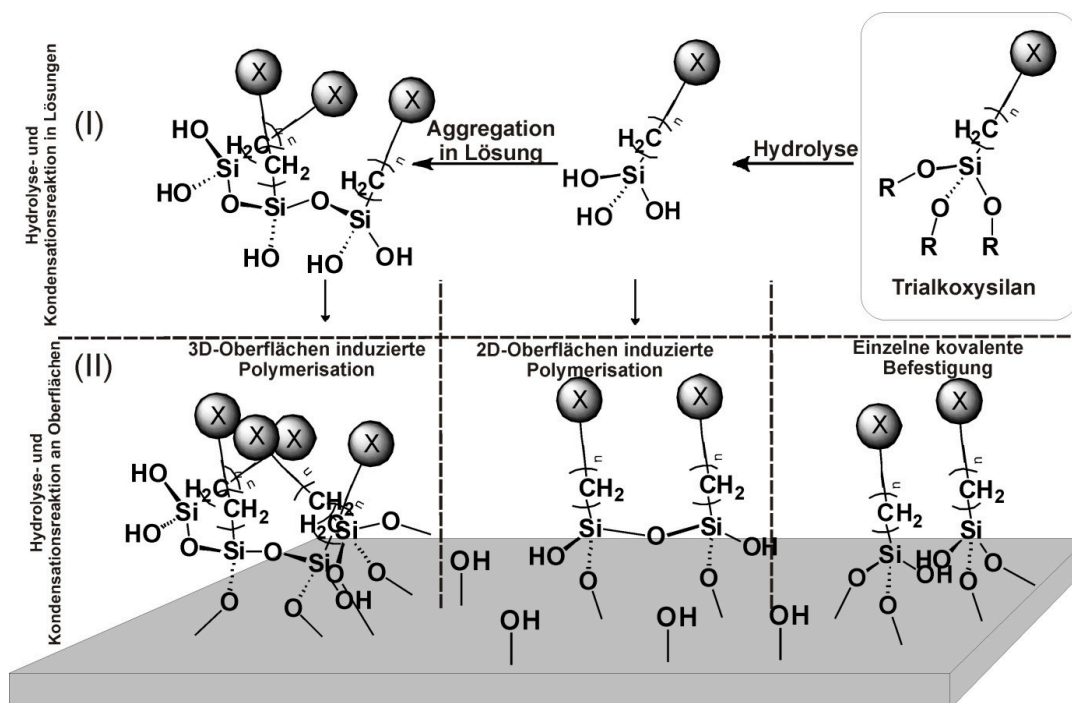


Abbildung 2-8: Angenommene Oberflächenmodifizierung mittels siliziumorganischer Trialkoxysilanmonomere [53].

Die Abscheidetechniken der Trialkoxysilane an den Festkörperoberflächen sind vielfältig. So können Trialkoxysilane aus wässrigen Lösungen, aus getrockneten alkoholischen Lösungen, aus alkoholisch-wässrigen Lösungen und aus Dampf abgeschieden werden [54], wobei die Trialkoxysilane vor einer Abscheidung an oxidischen Festkörperoberflächen zu metastabilen Silanolen hydrolysiert werden müssen. Es gibt säure- und basekatalysierte Hydrolyse. Nähere Informationen über Mechanismen der säure- oder basekatalysierten Hydrolyse sind aus der kinetischen Untersuchung von Pohl [55] und Belgacem [56] zu entnehmen. Des Weiteren konnten die Resultate ihrer experimentellen Arbeit zeigen, dass säure- und basekatalysierte Hydrolyse zu der Gruppe der konzentrierten polaren Reaktionen mit der Bezeichnung „bimolekulare nukleophile Substitutionsreaktion“ ($\text{S}_{\text{N}}2$) gehört, welche mit Brønstedt-Säure-Base-Reaktionen vergleichbar ist.

Neben einer Hydrolysereaktion der Alkoxygruppen des Organosilans erfolgt parallel eine Kondensationsreaktion der Silanolgruppen unter Ausbildung einer Siloxanbindung. Der Ablauf der Kondensation kann, wie auch die Hydrolyse, säure- oder basekatalysiert werden. Bei dem Mechanismus der basekatalysierten Kondensationsreaktion handelt es sich um eine nukleophile Substitutionsreaktion [55]. Bei der basekatalysierten Kondensation werden in der

Regel sekundäre oder tertiäre Amine eingesetzt, welche den nukleophilen Angriff an der Si-O-Bindung zur Ausbildung der Siloxanbindung katalysieren [55]. Nach der Hydrolyse- und Kondensationsreaktion der Trialkoxysilane in der Lösung erfolgt eine Verankerung dieser auf der oxidischen Festkörperoberfläche. Diese Verankerung der vorhydrolysierten und vorkondensierten Organosilane erfolgt in zwei postulierten Schritte [57], [58], welche ebenfalls über Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen erfolgen. In Bezug auf spezifische Immobilisierung von Proteinen, Peptiden und Antikörpern werden häufig Epoxy-, Amino-, Vinyl- und Aldehydgruppen auf der organischen Seite der Trialkoxysilanmonomere eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit werden amino- und aldehydfunktionalisierte Trialkoxysilane verwendet.

2.3.5 Immobilisierung von HRP auf Polyurethanoberflächen

Zu den häufigsten verwendeten Trägermaterialien für spezifische Immobilisierungsmethoden gehören metallische Festkörperoberflächen. Diese können im wässrigen Medium teilweise in Form von Ionen in die Lösung übergehen und somit Oberflächen-Hydroxidgruppen mit basischen sowie sauren Charakter bilden.

In letzter Zeit lässt sich jedoch ein starker Trend bezüglich der Verwendung von Trägermaterialien aus Kunststoffen bei der Immobilisierung von Biomolekülen feststellen. Die Kunststoffe haben sowohl Vorteile als auch Nachteile gegenüber Glas- oder Metallträgermaterialien. Ein Vorteil liegt in der Herstellung von Kunststoffen. Während diese sehr leicht durch Spritzgussverfahren in jede gewünschte Form gebracht werden können, müssen Glas und Metalle aufwendig bearbeitet werden [9]. Außerdem lassen sich chemische, physikalische sowie optische Eigenschaften von Kunststoffen einstellen. Des Weiteren kann man durch den Einsatz von Kunststoffen, im Gegensatz zu unedlen Metallen, Oxidationsprozesse an der Luft sowie in wässriger Umgebung ausschließen [9]. Allerdings weisen Kunststoff-Oberflächen auch einen gravierenden Nachteil gegenüber Glas- und Metall-Oberflächen. Dieser Nachteil ist die chemische Trägheit der Kunststoffe. Viele Kunststoffe weisen lediglich ein aliphatisches CH-Gerüst ohne funktionelle Gruppen auf, andere tragen weniger reaktive Gruppen, welche sich für die Anbindung von Biomolekülen als ungeeignet erweisen [9]. Eine Immobilisierung von Biomolekülen auf einer inerten Kunststoff-Oberfläche kann daher nur durch Adsorption über hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen.

Um eine spezifische Immobilisierung auf Kunststoffoberflächen zu ermöglichen, muss die Inertheit der Kunststoffe über eine Modifizierung aufgehoben werden. Zu diesem Zweck wird in dieser Arbeit versucht eine niederenergetische Polyurethan-(PUR-) Oberfläche mit zwei Modifizierungsansätzen zu funktionalisieren. Der erste Ansatz beinhaltet eine O₂-

Plasmaaktivierung mit dem Ziel, sauerstoffhaltige Gruppen auf die PUR-Oberfläche aufzubringen. Diese sollen eine Anknüpfung von Trialkoxysilanen, welche über funktionelle Gruppen verfügen, die für eine Proteinimmobilisierung fähig sind, ermöglichen. In Abbildung 2-9 ist dieser Ansatz schematisch dargestellt. Im ersten Teil des Ansatzes wird die PUR-Oberfläche durch eine O₂-Plasmabehandlung aktiviert und mit einer hydralysierten 3-Aminopropyltrimethoxysilan-Lösung nachfolgend gepfropft.

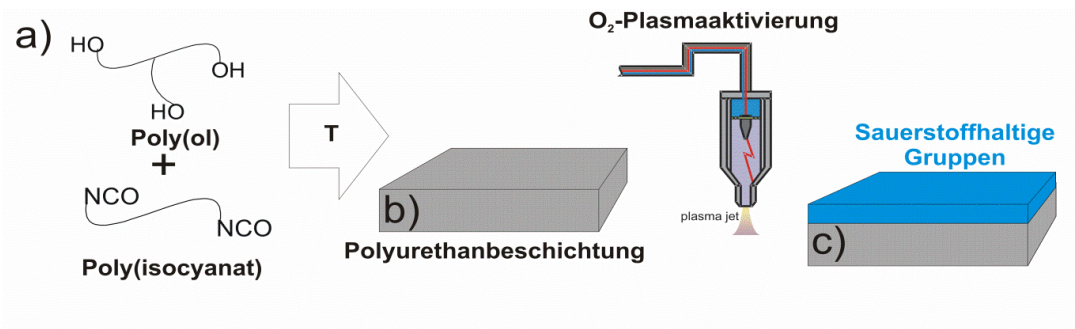


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung: Präparation (a), Härtung der Polyurethan-Beschichtung (b) und O₂-Plasmaaktivierung (c).

Der zweite Ansatz beruht auf der Druckluft-Plasmaaktivierung eines Polyurethan-Poly(dimethylsiloxan)-Hybridpolymers (PUR-PDMS) mit dem Ziel, funktionelle Silanol-Spezies des PDMS in dem PUR-Film zu erzeugen, welche für die Hydrolyse- und Kondensationsreaktion mit den Organosilanen befähigt sind (Abbildung 2-10).

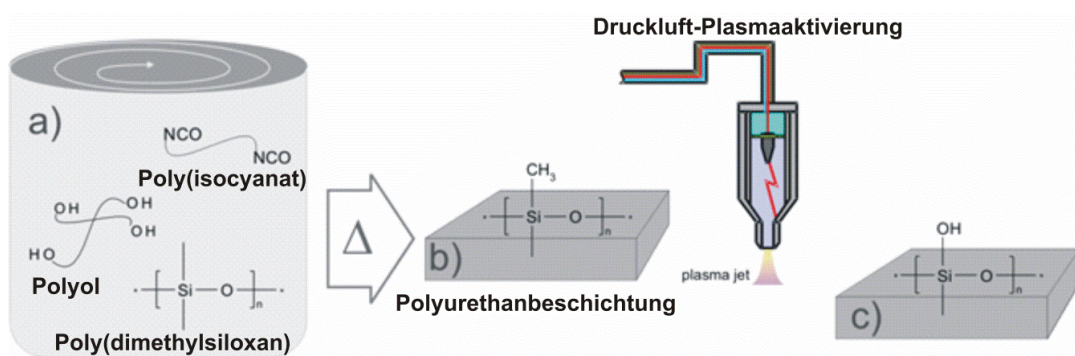


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung der Präparation des Siloxan-Polyurethan-Hybridsystem (a-b) und der Atmosphärendruck-Plasmabehandlung des Siloxan-Polyurethansystems (c).

Frühere Arbeiten [59], [60] zeigten bereits, dass der Siloxan-Polyether als Oberflächenadditiv aufgrund seiner hohen Kettenbeweglichkeit und niedrigen Oberflächenenergie in einem mehrschichtigen organischen Beschichtungssystem an die Oberfläche migriert. Die Eigenschaften eines migrierten Siloxan-Polyethers können durch verschiedene physikalische Methoden verändert werden. Eine Methode, solche Prozesse zu verändern, besteht darin, mittels einer photonreichen Strahlung (Vakuum-Ultraviolette Strahlung VUV mit Xenonlampe >1026 Pho-

stehen. Somit unterstreicht diese Formenvielfalt die Bedeutung für das chemische Verständnis in den möglichen Reaktionsmechanismen des Glutaraldehyds mit Proteinen. Zu diesem Zweck ist es wichtig an dieser Stelle einen Überblick über Glutaraldehyd als Vernetzungsreagenz durch eine Beschreibung der möglichen Strukturen und der chemischen Eigenschaften in wässriger Lösung sowie seiner hohen Reaktivität gegenüber Proteinen zu geben.

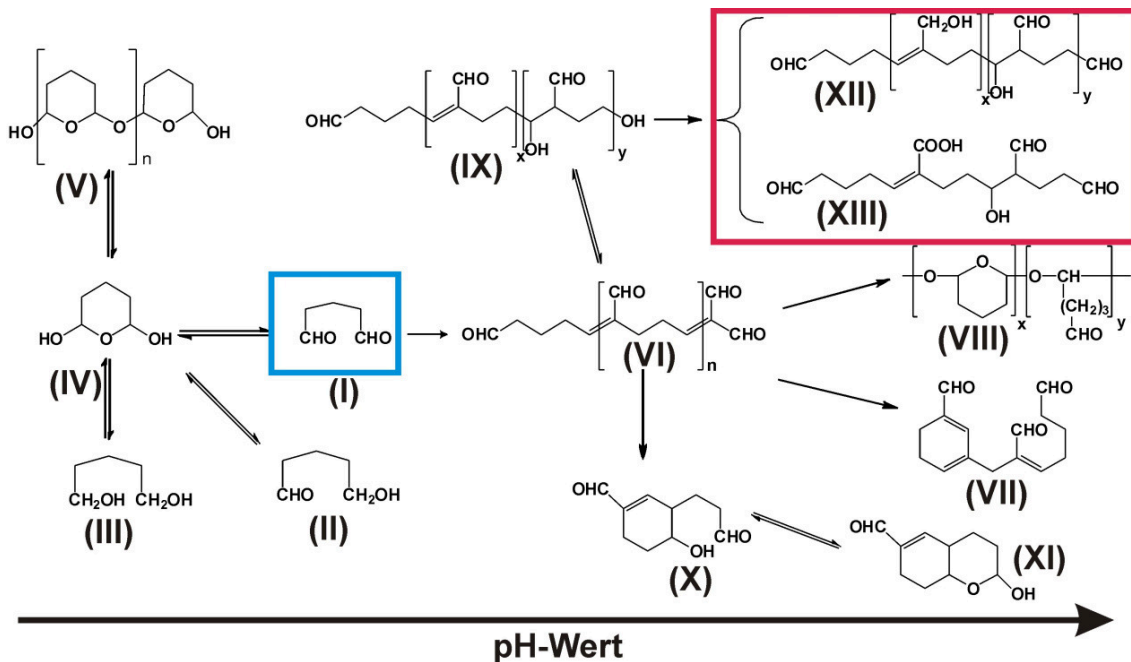


Abbildung 2-12: Zusammenfassung der möglichen Formen des Glutaraldehyds in wässriger Lösung [64].

Die Abbildung 2-12 gibt einen Überblick über mögliche molekulare Strukturen des Glutaraldehyds wieder, welche auf Berichten der letzten 40 Jahre basieren und detailliert in der Arbeit von Isabelle Migneault et al. [64] erläutert wurden. Da die Immobilisierung der Proteine unter Verwendung des Glutaraldehyds unter basischen Bedingungen erfolgt, soll nachfolgend der strukturelle Zustand des Glutaraldehyds unter diesen Bedingungen in wässriger Lösung näher betrachtet werden, welcher sich in der Abbildung 2-12 unter VIII befindet. Für eine Glutaraldehyd-Lösung mit neutralen oder leicht alkalischen pH-Werten werden unterschiedliche Oligomere und polymere Formen beschrieben, die auf Aldolkondensationsreaktionen bzw. auf wasserkatalysierte Polymerisationsreaktionen des Glutaraldehyds zurückzuführen sind. Im Jahr 1980 untersuchten Margel und Rembaum die Aldolkondensation des Glutaraldehyds im pH-Bereich von 7,0 - 13,5. Sie erhielten Polyglutaraldehyde und schlugen die Struktur XII und XIII nach spektroskopischer und elektrochemischer Analyse vor [64]. Demnach hängt die Wirksamkeit von Glutaraldehyden bei einer spezifischen Immobilisierung der Proteine von den Lösungsbedingungen ab. Außerdem kann Glutaraldehyd mit mehreren funktionellen Gruppen der Proteine, das heißt, nicht nur mit primären Aminogruppen, sondern

auch mit Thiol, Phenol und Imidazol reagieren. Verschiedene Daten bezüglich der Aldehyd-Reaktivität im pH-Bereich gegenüber den Aminosäuren Lysin, Tryptosin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin, Cystein, Prolin, Serin, Glycin und Arginin werden in der Arbeit von I. Migneault et al. [64] gegeben.

Da die Immobilisierung der Proteine in dieser Arbeit unter basischen Bedingungen abläuft, soll an dieser Stelle der vorgeschlagene Mechanismus der Reaktion zwischen Polyglutaraldehyd und Aminogruppen des Proteins erläutert werden (Abbildung 2-13).

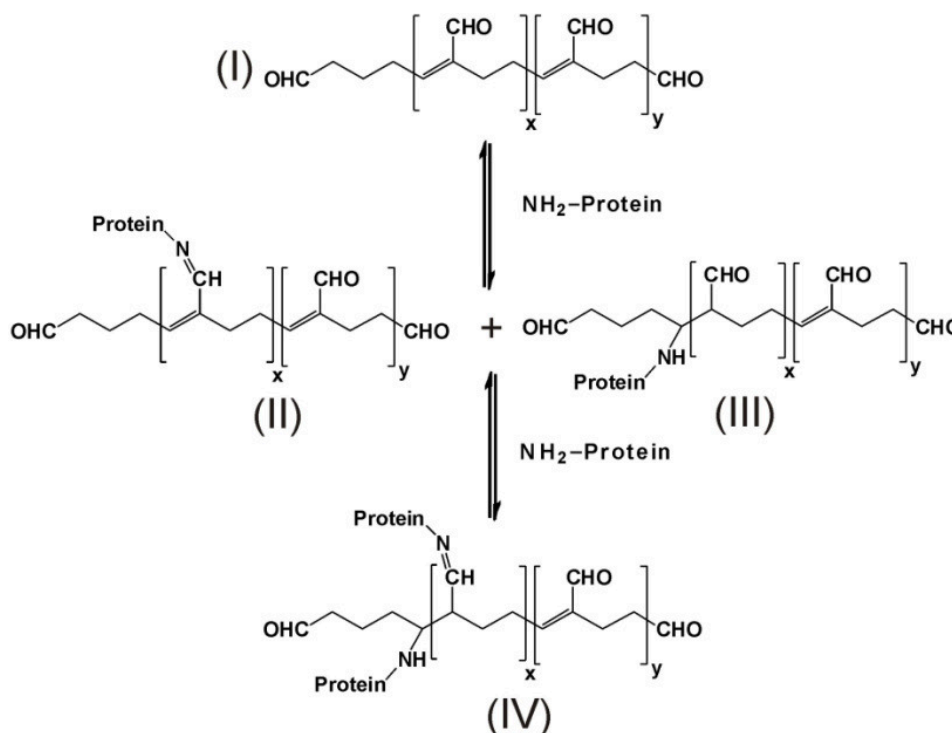


Abbildung 2-13: Reaktion des Polyglutaraldehyd mit Proteinen unter basischen Bedingungen [64].

Unter basischen Bedingungen reagieren α,β-ungesättigte oligomere Aldehyde (I) mit Aminogruppen unter Ausbildung von zwei Produkten, der Schiff'scher Base (Abbildung 2-13 II) und dem Michael-Additionsprodukt (Abbildung 2-13 III).

Die Abspaltung von Wasser zur Bildung einer Schiff'schen Base ist reversibel. Aus dem Grund wird in vielen Literaturstellen vorgeschlagen, durch die Anwendung von Reduktionsmitteln, wie Natriumborhydrid oder Natriumcyanoborhydrid, die Schiff'sche Base über reduktive Aminierung zu einer sekundären Aminogruppe zu reduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wird, wie bereits in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel eingesetzt.

2.3.6 Spezifische Immobilisierung von HRP auf Goldoberflächen

Um Einflüsse der spezifischen Immobilisierung auf Konformationsänderungen der Proteine zu untersuchen, steht hier eine leistungsstarke Oberflächenanalyse zur Verfügung, die Polarisations-Modulations-Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (PM-IRRAS). Sie ist in der Lage, strukturelle Veränderungen der biologischen Systeme an Oberflächen zu untersuchen. Bei der Durchführung einer Messung werden die Proteine weder verändert noch zerstört. Solche Experimente erfolgen in einem Reflexionsmodus unter Nutzung reflektierender Substratmaterialien mit einer hohen optischen Dichte. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit Au-SiO₂-Siliziumwafer als Substratmaterial bei der Immobilisierung der Proteine genutzt.

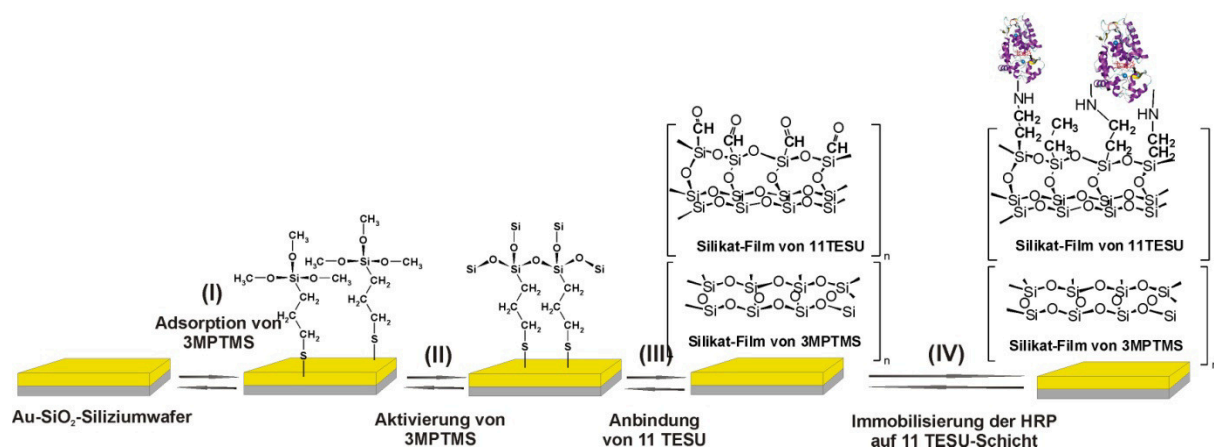


Abbildung 2-14: Schema der spezifischen Immobilisierungsstrategie von HRP auf einer starren Goldoberfläche.

Abbildung 2-14 gibt die Immobilisierungsschritte auf einer starren Goldoberfläche wieder. Im ersten Schritt erfolgt die Anbindung eines thiolbasierten Trialkoxysilans (Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPTMS). Das MPTMS-Molekül besteht aus zwei Bausteinen, einer reaktiven Thiol-Kopfgruppe auf der organischen Seite des Moleküls, welche die Bindung zum Gold-Substrat eingeht und einer Trimethoxysilylgruppe auf der anorganischen Seite des Moleküls.

Der erste Anbindungsschritt des MPTMS auf der Goldoberfläche wurde in mehreren Studien bereits unter dem analytischen Aspekt untersucht [65], [66], [67]. Die Thiol-Substanzen sind in der Lage, auf Goldoberflächen unter Abspaltung von Wasserstoff eine leicht polare Gold-Thiolat-Bindung (Au-S-R) zu bilden [68]. Allerdings haben solche thiolatbasierte Bindungen einen Nachteil aufgrund der Degradation der auf Thiolat basierenden Schichten durch die Oxidation unter Ausbildung von Sulfinaten (-SO₂) und Sulfonaten (-SO₃) [69], [70].

Im zweiten Schritt erfolgt die intramolekulare Vernetzung des auf der Goldoberfläche adsorbierten MPTMS, indem die Hydrolyse- und Kondensationsreaktion der Silyletherbindung

in dem MPTMS-Film stattfindet. Im dritten Schritt erfolgt die Anbindung von (Triethoxysilyl)undecanals (TESU) über die Hydrolyse und Kondensationsreaktion auf der vorhydrolysierten MPTMS-Schicht. TESU wird eingesetzt, da diese Substanz eine geringere Toxizität im Vergleich zu Glutaraldehyd aufweist. TESU verfügt über eine primäre funktionelle Aldehydendgruppe, welche im vierten Schritt bei der spezifischen Immobilisierung der Proteine genutzt wird [71], [72], [73].

2.4 Immobilisierte Proteine

In den nächsten Abschnitten werden die Eigenschaften der zu immobilisierenden Proteinen Meerrettichperoxidase und Anti-Frost-Protein Typ III näher erläutert. Da die Detektion der Anti-Frost-Proteine nur über deren Funktion möglich ist und es keine kommerziell erhältlichen Antikörper gegen diese Proteine gibt, wurde parallel ein zusätzliches Modelldetektionssystem mithilfe der Meerrettichperoxidase integriert. Des Weiteren soll auf die Sekundärstrukturdaten der verwendeten Proteine, eingegangen werden. Aus diesen Daten lassen sich Schlüsse ziehen, die für das Verständnis der Zusammenhänge der Aktivität und Konformation der immobilisierten Proteine an Festkörper-Interphasen unentbehrlich sind.

2.4.1 Meerrettichperoxidase

Die Meerrettichperoxidase (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP) ist ein hämhaltiges Enzym, welches starke Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid nutzt, um eine Vielzahl von organischen Verbindungen zu oxidieren. Die Sekundärstruktur der Meerrettichperoxidase besteht größtenteils aus α -Helices und einer kleinen Region aus β -Faltblattstrukturen (Abbildung 2-15 B), wie mittels Röntgenstruktur und IR-Spektroskopie ermittelt wurde, und enthält, wie auch die meisten charakteristischen Peroxidasen, eine Häm-Gruppe – Eisen-Protoporphyrin IX.

HRP wird in die Formen sauer, neutral und basisch unterteilt [74]. Kommerziell erhältliche HRP-Präparate enthalten hauptsächlich Isoenzym C und werden als neutrale bis leicht basisch ($pI \approx 8,4$) eingestuft [75]. Die molekulare Masse der HRP beträgt ca. 42 kDa und das Molekül hat die Dimension $4,03 \times 6,57 \times 11,7 \text{ nm}^3$. Die Polypeptidkette der HRP ist aus 308 Aminosäuren aufgebaut [76], aus welchen verschiedene Sekundärstrukturanteile hervorgehen (Abbildung 2-15 B). Im Inneren der Polypeptidkette befinden sich zwei verschiedene Typen von Metallzentren, einmal das Eisen(III)-Protoporphyrin IX und zwei Calcium (II)-Ionen, welche für die funktionelle und die strukturelle Integrität des Enzyms überaus wichtig sind [77].

Im Rahmen dieser Dissertation wird die Meerrettichperoxidase eingesetzt, um die katalytische Aktivität der immobilisierten Peroxidase an der Festkörperoberfläche zu untersuchen. Beim Aktivitätstest wird das Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin als Ausgangsstoff eingesetzt, welches von HRP in Anwesenheit des Cofactors H_2O_2 zum Produkt Tetramethyl-1,1'-diphenonchinon-4,4'-diimoniumsalz (III) oxidiert wird. Die Anwendung der HRP in einem immobilisierten Zustand zur quantitativen Untersuchung der Enzymaktivität an Festkörperoberflächen wurde in einigen Arbeiten bereits beschrieben [36], [78].

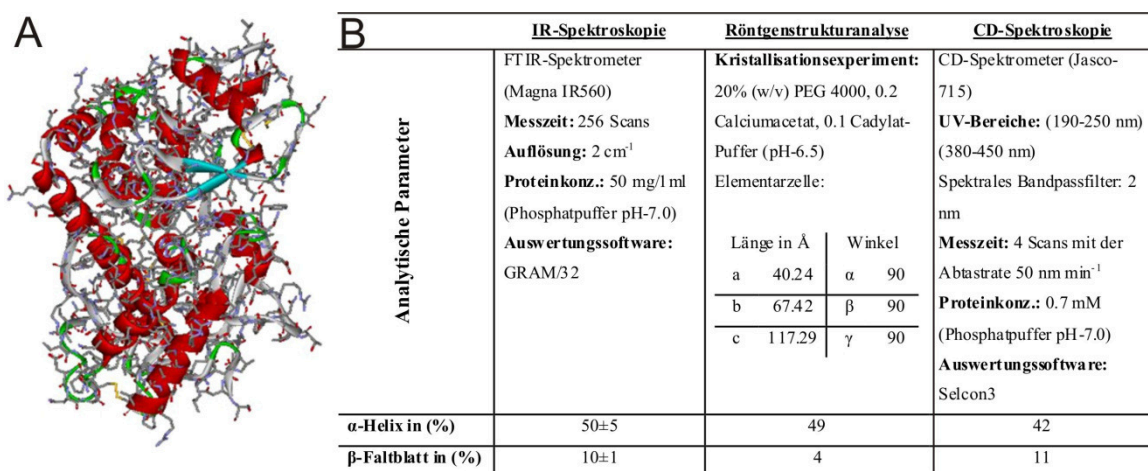


Abbildung 2-15: Dreidimensionale Röntgen-Kristallstruktur der Meerrettichperoxidase(A). Sekundärstrukturdaten aus IR-spektroskopischer Analyse [79], Röntgenstrukturanalyse [80] und CD-Spektroskopie [81] (B).

Der Mechanismus der Zwei-Elektronen-Oxidation des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins mittels Meerrettichperoxidase wurde umfangreich untersucht und wird an dieser Stelle nur kurz betrachtet.

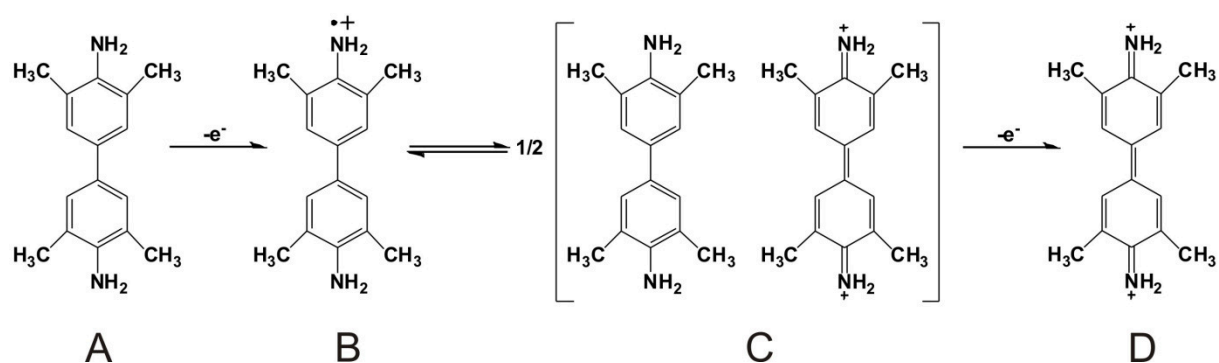


Abbildung 2-16: Zwei-Elektronen-Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [82].

In Anlehnung an die Arbeit von Josephy et al. [83] kann angenommen werden, dass im ersten Schritt das farblose 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin $\lambda_{\text{max}} = 285\text{ nm}$ (A) unter katalytischer Einwirkung der Meerrettichperoxidase und somit durch eine Ein-Elektron-Oxidation zum blaugefärbten 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation (Ladungs-Transfer-Komplex) (B-C)

oxidiert wird. Bei diesem kann eine maximale Absorption bei 210 nm, 380 nm und 650 nm bei $\text{pH} > 1,0$ gemessen werden. Dieses Radikalkation wird durch eine weitere Oxidation zum gelbgefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenonchinon-4,4'-diimoniumion umgewandelt. Durch die Detektion der Absorption bei $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ des entstandenen Produktes kann eine Aussage über die enzymatische Aktivität der immobilisierten Meerrettichperoxidase getroffen werden.

2.4.2 Anti-Frost-Proteine und Anti-Frost-Protein Typ III

Die Natur hat im Wesentlichen zwei Strategien entwickelt, um das Überleben von Lebewesen, wie z.B. Fischen, Pflanzen und Insekten in kalten Gegenden zu ermöglichen. Diese sind die Gefriervermeidung und die Gefriertoleranz. Bei gefriervermeidenden Organismen erfolgt die Verhinderung der Eisbildung, indem die Konzentration an Polyalkoholen und Zuckern erhöht wird, wodurch der Eisschmelzpunkt des Blutes erniedrigt wird. Häufig vorkommende Verbindungen sind Glucose, Mannitol, Glycerol und Trehalose [84]. Die dadurch verursachte Verschiebung des Eisschmelzpunktes beruht auf einer kolligativen Eigenschaft der gelösten Substanzen. Eine weitere Strategie der Gefriervermeidung beruht auf Anti-Frost-Proteinen. Die Wirkungsweise der Anti-Frost-Proteine spiegelt sich in der Strukturierung der Eiskristalle, einer Rekristallisation und der thermischen Hysterese (TH, engl. *Thermal Hysteresis*) wider [85]. Die thermische Hysterese stellt einen Unterschied zwischen Schmelzpunkt und Hysteresegefrierpunkt dar.

Einige der aufgestellten Hypothesen favorisieren das Modell „Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus“, welches von Kristiansen et al. [86] vorgestellt wurde und bei welchem die AFP in einer Art „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ durch spezielle, räumlich voneinander getrennte hydrophile und hydrophobe Aminosäure-Seitenketten an den Eiskristallen adsorbieren.

Allerdings wurde inzwischen ein weiterer Wirkmechanismus der Anti-Frost-Proteine von der Gruppe um Havenith an der Ruhr-Universität Bochum mittels THz-Spektroskopie beobachtet. Dieser basiert nicht, wie bislang angenommen, auf dem Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus, sondern belegt, dass die Interaktionen der freistehenden Aminosäure-Seitenketten des AFP mit den Wassermolekülen in der Eisbindungsstelle über eine größere Distanz auf die Kristalle wirken können [87]. In diesem Zusammenhang ist der genaue Wirkmechanismus der Anti-Frost-Proteine immer noch nicht vollständig aufgeklärt.

Seit den ersten Untersuchungen im Jahr 1957 von Scholander et al. [88] und der Entdeckung der Anti-Frost-Proteine in antarktischen Fischen von DeVries und Wohlschlag [89] wurden in den letzten Jahrzehnten diverse AFP in den unterschiedlichsten Spezies identifiziert. Neben

der Existenz von AFP in zahlreichen Fischarten [90] gibt es auch Nachweise für die Anwesenheit von AFP in Insekten [91], Pflanzen [92], Bakterien [93] sowie Kieselalgen [94].

Die in Fischen entdeckten Anti-Frost-Proteine unterscheiden sich in der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur, und werden in das Glycoprotein AFPG und die Polypeptide AFP Typ I bis IV [95] eingeteilt. In dieser vorliegenden Arbeit wird das AFP Typ III vom Fisch Ocean Pout (*Macrozoarces americanus*) bei den Experimenten genutzt. Beim AFP Typ III handelt es sich um kleine globuläre Proteine mit einer molekularen Masse von 7,0 kDa und mit β -Sandwichstruktur, die aus ungefähr 65 Aminosäuren aufgebaut und zwei Tandem-Motive im Inneren mit vier kurzen β -Strängen und einer α -Helix besitzt.

Da in dieser Arbeit die strukturelle Veränderung des AFP Typ III untersucht wird, werden in der Abbildung 2-17: Dreidimensionale Röntgen-Kristallstruktur des Anti-Frost-Proteins Typ III (A). Sekundär-strukturdaten aus IR-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie (B). Die möglichen Sekundärstrukturanteile von AFP Typ III aufgeführt, die mit den verschiedenen Analysemethoden wie IR-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse sowie NMR-Spektroskopie bestimmt wurden.

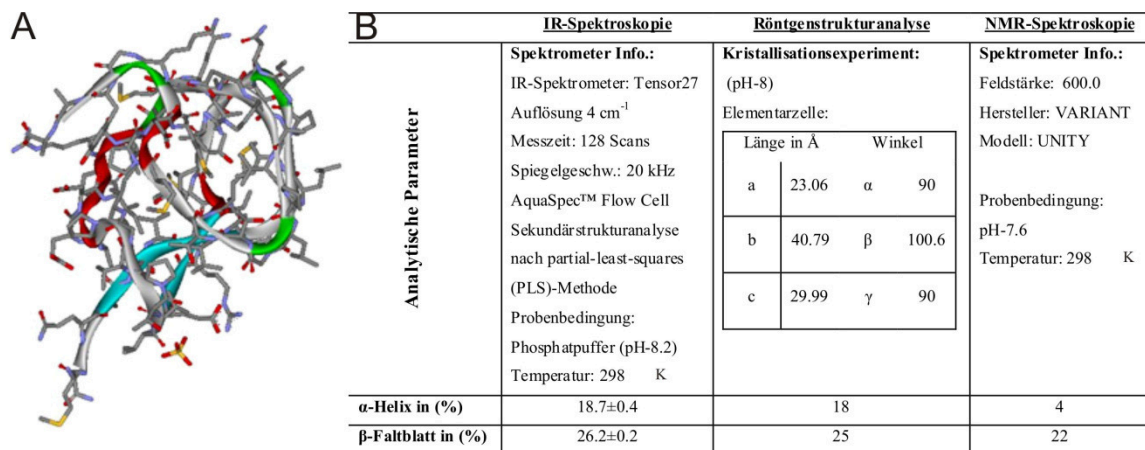


Abbildung 2-17: Dreidimensionale Röntgen-Kristallstruktur des Anti-Frost-Proteins Typ III (A). Sekundär-strukturdaten aus IR-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse [96] und NMR-Spektroskopie [97] (B).

Die AFP sind wegen ihrer einzigartigen physikalischen Eigenschaften – wie der nicht-kolligativen Gefrierpunktniedrigung (Hysteresegefrierpunktniedrigung), ihrer rekristallisationshemmenden Eigenschaften sowie der Strukturierung der Eiskristallmorphologie – von großem wirtschaftlichem Interesse. Es gibt Untersuchungen für ihren Einsatz in der Lebensmittelindustrie [98], im Bereich Kryochirurgie [99], der Kryokonservierung im landwirtschaftlichen Bereich [100], der Aquakultur [101], der Kryokonservierung in der Humanmedi-

zin [102], der Gasindustrie als biologische Gashydratinhibitoren [103] und der Oberflächenbeschichtung als Anti-Eis-Schutz [104], [105] untersucht.

2.5 Schwingungsspektroskopie an Proteinen

Proteine bilden eine der vielfältigsten Stoffklassen der natürlichen Materie und unterscheiden sich untereinander nicht nur in ihrer Zusammensetzung, sondern auch in ihren Strukturebenen, die grundlegend in Primärstruktur, Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und Quartärstruktur eingeteilt werden. Die Kenntnis dieser Strukturebenen eines Proteins stellt eine wichtige Grundlage für das Verständnis der vielfältigen Eigenschaften der Proteine dar. Um diese spezifischen Kenntnisse über die Strukturebenen der Proteine zu gewinnen und mehr oder weniger Einblicke in bestimmte Teilbereiche der Proteinstrukturebenen zu gewähren, steht eine Vielzahl von experimentellen Methoden zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Schwingungs-Infrarot-Spektroskopie als proteinanalytische Methode zur Untersuchung der strukturellen Veränderungen an Meerrettichperoxidase und Anti-Frost-Protein Typ III in wässriger Lösung sowie an Festkörperoberflächen angewandt. Diese schwingungsspektroskopische Methode ermöglicht die Analyse der Zusammenhänge der strukturellen Aktivität der an der Festkörperoberfläche immobilisierten und in wässriger Lösung gelösten Proteine. Da die spektroskopischen Untersuchungsmethoden zur Strukturbestimmung in der Regel oft nur einen kleinen Ausschnitt des Proteins, wie die Polypeptidbindung, unter Verwendung von verschiedenen mathematischen Methoden und bei verschiedenen Versuchsbedingungen betrachten, werden deshalb nun in nachfolgenden Abschnitten die Vorteile und Nachteile, beziehungsweise die Einschränkungen, der IR-Spektroskopie in wässriger Lösung sowie an Festkörperoberflächen im Vergleich zu anderen proteinanalytischen Methoden dargestellt. Abschließend soll dann auf die schwingungsspektroskopische Analyse der Amid-Banden, die zur Abschätzung der Sekundärstruktur der Proteine herangezogen werden, sowie auf die mathematischen Methoden zur Bandenauflösung eingegangen werden.

2.5.1 Schwingungsspektroskopie an Proteinen in wässriger Lösung

Bereits in den 1950er Jahren konnte durch die Pionierarbeit von Elliot und Ambrose die Möglichkeit der IR-Spektroskopie zum Erhalt struktureller Informationen über Proteine gezeigt werden [106]. Seitdem hat die Nutzung der IR-Spektroskopie als Methode zur Quantifizierung der Sekundärstruktur der Proteine aufgrund deren vielfältigen Messmöglichkeiten in wässrigen Lösungen [107] sowie in der Luft-Wasser-Interphase [108] als auch an der Protein-Substrat-Interphase zugenommen. Wobei die Zuordnung von infrarotspezifischen Schwin-

gungssignalen insbesondere bei Sekundärstrukturänderungen zu einzelnen Strukturelementen eine analytische Herausforderung darstellt. In dieser Arbeit wird diese schwingungsspektroskopische Messtechnik im Transmissionsmodus genutzt, um vor allem Informationen über die Sekundärstrukturveränderungen des Anti-Frost-Proteins sowie des Enzyms Meerrettichperoxidase in wässriger Lösung zu gewinnen. Dabei soll zunächst der Untersuchungsfokus auf die temperatur- und pH-induzierte Strukturveränderung an Anti-Frost-Protein Typ III gerichtet werden, wobei die strukturelle Auswirkung auf die Aktivität des gelösten Anti-Frost-Proteins Typ III in Kombination mit Sonokristallisation untersucht werden soll. Der Grundgedanke bei diesen infrarotspektroskopischen Untersuchungen ist, mit den generierten IR-Daten geeignete Immobilisierungsparameter für das Anti-Frost-Protein Typ III in wässriger Lösung festzulegen, welche unter den zu untersuchenden Immobilisierungsbedingungen keine Einschränkungen in der Struktur und in der Aktivität des Proteins darstellen. Die Struktur der Proteine in wässriger Lösung kann – wie bereits erwähnt – durch eine Vielzahl von experimentellen Messtechniken analysiert werden. Zu diesen experimentellen Messtechniken zählen außer IR-Spektroskopie unter anderem Röntgenkristallographie [109], Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) [110], elektronische Circular dichroismus- [111], Raman-Spektroskopie [112], Elektronenspinresonanz (ESR) [113] und Schwingungs-Circular dichroismus (VCD, engl. *Vibrational Circular Dichroism*) [114].

Die Vorteile sowie mögliche Nachteile der IR-Spektroskopie in wässriger Lösung in Bezug auf die Sekundärstrukturbestimmung der Proteine ergeben sich aus dem Vergleich mit anderen spektroskopischen Methoden. Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionstechnik von rechts und links circular polarisiertem Licht durch eine biologische Probe im UV/Vis-Bereich des elektromagnetischen Spektrums [115]. Der Circular dichroismus wird bei Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit asymmetrischen α -Kohlenstoffatomen im Bereich des Peptidrückgrates und von den aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Protein-CD-Spektren lassen sich generell in zwei charakteristische spektrale Bereiche aufteilen: den Bereich von 160 bis 240 nm, den sog. Peptidbereich; und den Bereich von 240 nm bis 300 nm, in dem der CD-Effekt vor allem von den Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren bestimmt wird [115]. Die CD-Spektren von Proteinen im Peptidbereich unterhalb von 250 nm sind besonders empfindlich für die Detektion der Sekundärstruktur.

Bei der Betrachtung der spektralen Bereiche im CD-Spektrum ist zunächst zu erkennen, dass die Sekundärstrukturbestimmung an Proteinen, welche eine hohe Konzentration von aromatischen Aminosäuren besitzen, aufgrund der möglichen auftretenden Überlappungen mit dem

für die Sekundärstrukturinterpretation erforderlichen spektralen Peptidbereich erschwert wird und möglicherweise zu großen Abweichungen führen kann. Da Proteine aus mehreren Proteindomänen aufgebaut sind, findet selbst bei Schwingungs-Infrarot-Spektroskopie noch eine starke Überlappung von Signalen statt. Einen weiteren Nachteil gegenüber der IR-Spektroskopie stellt die Kalibrierung des CD-Gerätes vor jeder Proteinmessung mithilfe von geeigneten Substanzen wie (1S)-(+)-Campher-10-Sulfonsäure dar, während bei der Proteinmessung mittels IR-Spektroskopie solche Eichmessungen entfallen. Bei der Bestimmung der Sekundärstrukturen mittels CD-Spektroskopie werden heutzutage zahlreiche Programme, wie PROVENCHER&GLÖCKNER (CONTIN) und das Verfahren der „Variablen Selektion“ nach JOHNSON (VARSLC1), die auf verschiedenen mathematischen Bedingungen beruhen, genutzt [115], [116]. Da die Sekundärstrukturanteile durch verschiedene mathematische Lösungen in der CD-Spektroskopie bestimmt werden, weisen diese im Vergleich zur IR-Spektroskopie zunächst eine analytisch bedingte Abweichung auf (Tabelle 1). Aus diesem Grund muss beim Vergleich von CD-Proteinspektren untereinander auf die Einheitlichkeit der Auswertprogramme geachtet werden. Außerdem sind zur Anregung von Elektronenübergängen bei CD-Spektroskopie größere Energien von 300 - 160 kJ/mol erforderlich als die von Schwingungen durch IR-Strahlung mit der Energiedifferenz von 60 - 2,5 kJ/mol, welche auch einen gewissen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine ausüben kann [115].

Eine weitere spektroskopische Methode, die ebenfalls zur Sekundärstrukturanalyse an Proteinen in wässriger Lösung genutzt wird, ist die Raman-Spektroskopie. Die Vorteile der Raman-Spektroskopie gegenüber der IR-Spektroskopie liegen darin, dass im Gegensatz zu IR-Spektren bei den Raman-Spektren außer den Amid-Banden der Peptidbindung noch zusätzlich die Aminosäureseitenketten-Banden der aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin (Tyr-Bande) oder Tryptophan (Try-Banden) dominieren. Die Amid-Banden variieren mit der Proteinkonformation, während die Aminosäureseitenketten-Banden wie Tyr- und Try-Banden zusätzliche Informationen über die lokale Umgebung dieser Gruppen in Proteindomänen liefern können [115]. Ein weiterer Vorteil der Raman-Spektroskopie gegenüber der IR-Spektroskopie ist, dass man mithilfe der Resonanz-Raman-Methode (RR-Methode) durch die Wahl der Anregungswellenlängen in Proteinen selektiv die Banden der Schwingungen bestimmter Molekülsegmente oder funktioneller Gruppen in einem RR-Spektrum in der Intensität erhöhen kann [115]. Allerdings werden bei der Resonanz-Raman-Spektroskopie zur Frequenzverdopplung des 488-nm- oder 514,5-nm-Argon-Lasers mit hoher Photonenenergie im Gegensatz zur IR-Spektroskopie mit dem Wärmestrahler genutzt. Der Argon-Laser kann einen degradierenden Einfluss auf die biologischen Systeme während der Messung ausüben [117]. Gemäß den

quantenmechanischen Beschreibungen ist eine elektromagnetische Welle in der Lage, Energie in gequantelten Paketen oder Photonen abzustrahlen. Die Gemeinsamkeit der Raman- und der CD-Spektroskopie mit der IR-Spektroskopie liegt in der Bestimmung des Sekundärstrukturanteiles von Proteinen bezüglich der mathematischen Methoden, die auf der Kalibrierung der Basisspektren mit den Sekundärstrukturanteilen aus Röntgenstrukturanalyse beruhen [115].

Bei der Röntgendiffraktometrie werden die Proteine in kristallinem Zustand gemessen und zwar in Form von großen, möglichst perfekt aufgebauten einzelnen Einkristallen, während die Proteine bei CD-, Raman- und IR-spektroskopischen Messungen in wässriger Umgebung gemessen werden. Den großen Unterschied zwischen einem Protein-Einkristall und einem gelösten Protein stellt die Solvation der Proteine in wässriger Umgebung dar. Außerdem haben Proteine in Lösung mehr Freiheitsgrade als im streng geordneten Kristallgitter und können dadurch eine Vielzahl an Sekundärstrukturpositionen annehmen und dynamisch zwischen diesen wechseln. Da die spektroskopischen Methoden zur Sekundärstrukturbestimmung den Basis-Satz mit bekannten Proteinstrukturen aus Röntgenstrukturanalyse nutzen, sollen somit die mithilfe der Schwingungsspektroskopie ermittelten Resultate als relativ angesehen werden und dürfen somit bei einigen Fragestellungen nicht überinterpretiert werden.

Ein weiterer einschränkender Punkt der Röntgenstrukturanalyse ist die Zugabe von Präzipitans bei Kristallisationsvorgängen. Präzipitans können eventuell aufgrund der Interaktionen mit den Protein-Oberflächen die Sekundärstruktur der Proteine beeinflussen. Als Präzipitans werden zum Beispiel Salze (vor allem Natriumcitrat, Ammoniumsulfat, Natrium-Kaliumphosphat) oder organische Verbindungen wie Polyethylenglycol (400-2000 Da) sowie Alkohole wie Ethanol oder Propanol verwendet. Eine wichtige Rolle spielt ebenfalls der pH-Wert im Kristallisationsansatz, der meist im Bereich von $\text{pH} = 4$ bis 10 in kleinen Intervallen variiert wird. Hierzu existieren verschiedene Kristallisationsmethoden bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie Hanging-drop-Methode, Mikrodialyse oder Kristallisation in Gelen oder unter Öl [118]. Für die Durchführung der Röntgenmessungen an Protein-Einkristallen werden Röntgenstrahlen von einem Drehanodenröntgengenerator im Vergleich zu IR-Spektroskopie mit sehr energiereichen Röntgenphotonen im Bereich von 100 eV bis 0,2 MeV erzeugt, welche sich auf die Proteinstruktur der Proteine degradierend auswirken können [119], [120].

Die letzte Methode, die hier vorgestellt werden soll, ist die NMR-Spektroskopie, welche zunächst im Gegensatz zur IR-Spektroskopie eine deutlich niedrigere Zeitauflösung hat [121]. Während NMR-Signale bei dynamischen Prozessen auf der Millisekundenskala miteinander verschmelzen, können Signale der molekularen dynamischen Prozesse auf der

Pikosekundenskala mittels IR-Spektroskopie getrennt werden. Außerdem kann sie gegenüber der Kristallographie auch in wässriger Lösung angewandt werden. Die Einschränkung der NMR-Spektroskopie bei der Sekundärstrukturanalyse von Proteinen liegt zum jetzigen Zeitpunkt im Molekulargewicht des Biomoleküls. Mit steigendem Molekulargewicht nehmen die Breite der Resonanzlinien und deren Anzahl zu, was zu einer Überlappung der Peaks und damit einhergehenden schlechteren Auflösung führt. Heutzutage versuchen neue NMR-Techniken wie TROSY und CRINEPT die Spektren von supramolekularen Strukturen mit Molekulargewichten von > 100 kDa aufzulösen [122].

Die Messungen an Proteinen mittels der hier vorgestellten analytischen Methoden erfolgen, wie bereits erwähnt, bei verschiedenen analytischen Bedingungen und sollen bei der Interpretation der Sekundärstrukturbestimmung in Betracht gezogen werden, was schließlich zu Diskrepanzen und zu sichtbaren Unterschieden in der ermittelten Strukturdomäne an Proteinen führt. Um diese Unterschiede vor Augen zu führen, gibt die Tabelle 1 die Sekundärstrukturanteile den Proteine Lysozym, Ribonuklease A und α -Chymotrypsin wieder, welche mit verschiedenen analytischen Methoden bestimmt wurden.

Tabelle 1: Vergleich der mit IR-, Raman-, Circular dichroismus-, NMR-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse (engl. *X-ray*) ermittelten Sekundärstrukturanteile.

Protein	Sekundärstrukturanteile in (%)				Methode	Referenzen
	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	Random coil		
<u>Lysozym</u>	40	19	27	14	IR	[107]
	32	9	-	59	Raman	[112]
	29-45	11-39	8-26	8-60	CD	[107]
	34	11	-	-	NMR	[123]
	45	19	23	13	X-ray	[107]
<u>Ribonuklease A</u>	15	40	36	9	IR	[107]
	14	35	-	51	Raman	[112]
	12-30	21-44	11-22	19-50	CD	[107]
	20	33	-	-	NMR	[124]
	23	46	21	10	X-ray	[107]
<u>α-Chymotrypsin</u>	9	47	30	14	IR	[107]
	4	34	-	62	Raman	[112]
	8-15	10-33	2-22	38-70	CD	[107]
	-	-	-	-	NMR	-
	8	50	27	15	X-ray	[107]

Somit werden die Differenzen in den Sekundärstrukturanteilen beim Vergleich der erhaltenen Struktur von Lysozym in Lösung durch NMR-Analyse zu Lysozym in kristalliner Form sicht-

bar. Diese Differenzen der Sekundärstrukturanteile sind besonders durch die erhöhte Konzentration der Sekundärdomänen α -Helix und β -Faltblatt in kristalliner Form im Gegensatz zur NMR-Methode erkennbar und auf die verschiedene Natur der intramolekularen sowie intermolekularen Wechselwirkungen der gelösten Proteine im Vergleich zur kristallinen Form zurückzuführen. Ein wesentlicher Vorteil der Schwingungsspektroskopie an Proteinen gegenüber anderen spektroskopischen Methoden ist die Möglichkeit, Proteine unter nahezu nativen Bedingungen in wässrigen Lösungen zu vermessen.

Grundsätzlich geben bei einer Sekundärstrukturbestimmung die charakteristischen Schwingungsfrequenzen einer Peptidbindung Aufschluss über die Sekundärstrukturzusammensetzung bzw. Strukturveränderung der Proteine, welche durch eine Veränderung der Amid-Banden identifiziert werden. Jede Peptidbindung weist eine starre planare Struktur aufgrund einer Resonanzstabilisierung auf, welche der Peptidbindung einen ca. 40 %-igen Doppelbindungscharakter verleiht und die lokale räumliche Anordnung des Peptidgerüsts (Faltungsmuster der regulären Sekundärstrukturen wie Helices, Faltblätter, Schleifen, *random coil*), die häufig durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, beschreibt. Als reguläre Sekundärstrukturen bezeichnet man solche Strukturen, welche aus Sequenzen mit gleichem Torsionswinkel (auch als Rotationswinkel oder Diederwinkel bezeichnet) Φ (phi) und Ψ (psi) bestehen. Der Torsionswinkel Φ beschreibt eine Drehung um die $\text{HC}_\alpha\text{-NH}$ -Bindung, während der Torsionswinkel Ψ für eine Drehung um die $\text{C}_\alpha\text{-CO}$ -Bindung steht. Diese Torsionswinkel nehmen unterschiedliche Werte je nach Sekundärstruktur an.

Die ersten IR-spektroskopischen Untersuchungen an Proteinen bezüglich der Sekundärstruktur erfolgten rein empirisch, indem zuerst Korrelationen zwischen den charakteristischen Schwingungsfrequenzen und Strukturdomänen gesucht wurden, um eine Abhängigkeit der Schwingungsfrequenzen von den Sekundärstrukturen bei Peptiden und Proteinen festzustellen [125]. In diesem Kontext wurden Normalschwingungsanalysen von Modellpeptiden mit bekannter Struktur durchgeführt und folgende Annahmen bestätigt, dass die Amid-I- und Amid-II-Bande verschiedene Sekundärstrukturelemente annehmen und somit über diese auch Strukturinformationen gewonnen werden können [126].

Auf der Basis dieser empirischen Regeln werden bestimmte Zuordnungen getroffen, welche in Tabelle 2 zusammengefasst sind, wobei derartige Zuordnungen allerdings nicht unbedingt ihre wahrhafte Gültigkeit darstellen [127].

Bei der theoretischen Zuordnung von Sekundärstrukturanteilen in der Amid-I- und Amid-II-Bande wird deutlich, wie empfindlich die Amid-I-Bande im Vergleich zur Amid-II-Bande auf die verschiedenen Sekundärstrukturen durch eine Veränderung der Schwingungsfrequenz rea-

giert. Außerdem kann man in Tabelle 2 erkennen, wie groß die Überlappung zwischen den Sekundärstrukturanteilen ist. Aus diesem Grund erfordert die Interpretation von überlappenden Schwingungsmoden in Bezug auf die Analyse von Polypeptiden ein genaues Verständnis der Normalschwingungen.

Tabelle 2: Theoretische Zuordnung von Sekundärstrukturanteilen zu Amid-I- und Amid-II-Bande [126].

Sekundärstrukturanteile	Amid-I-Bande ^a (cm ⁻¹)	Amid-II-Bande ^a (cm ⁻¹)
Antiparalleles β-Faltblatt	1685 (w), 1668 (vw), 1632 (s)	1550 (w), 1530 (s), 1510 (w)
Paralleles β-Faltblatt	1648 (w), 1632 (s)	1550 (w), 1530 (s)
α-Helix	1650 (s), 1646 (w)	1546 (s), 1516 (w)
β- und γ-Turns	1660 bis 1700	keine Angaben
Ungeordnete Strukturen	1658	1520

^(a) Abkürzungen: stark (s), schwach (w), sehr schwach (vw)

Um dieses Grundwissen zu Normalschwingungen einer Polypeptidkette zu erlangen, wurden Berechnungen an kleinen überschaubaren Systemen, in denen komplexe intermolekulare und intramolekulare Wechselwirkungen weitgehend ausgeschlossen sind, durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein kleineres überschaubares Modell-Peptid N-Methylacetamid (NMA) genutzt, welches den Grundbaustein einer Polypeptidkette darstellt und am häufigsten als monosubstituiertes Amid mittels Infrarot-, Raman- und CD-Spektroskopie untersucht wurde [125]. Die Abbildung 2-18 zeigt NMA in der trans-Konfiguration, bei der die C=O- und die N-H-Bindung auf entgegengesetzten Seiten der CN-Bindungen liegen, und entspricht somit der am häufigsten auftretenden trans-Konformation der Peptiden [128].

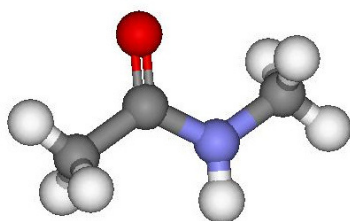


Abbildung 2-18: N-Methylacetamid als Modellpeptid zur Analyse von Normalschwingungen einer Peptidbindung [125].

Mit diesem Modell-Peptid wurde von Krimm et al. [129] die Kraftkonstantenmatrix berechnet. Die Kraftkonstantenmatrix beinhaltet die Kraftkonstanten zwischen den jeweiligen Atomen, die von der Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen abhängen [125]. Da die Wasserstoffbrückenbindungen die Sekundärstrukturdomänen stabilisieren, sind sie also direkt an der Proteinkonformation beteiligt. Nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundärstrukturnatur können ausgebildet werden, sondern auch Wassermoleküle der wässrigen Lö-

sung interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Amid-Banden der Peptidbindung. Damit hängen die Amid-Frequenzen von den Wasserstoffbrückenbindungen ab, was die Einschränkung und Komplexität des Schwingungsspektrums zur Strukturbestimmung erklärt [129].

Normalkoordinatenberechnungen von kleinen Modellpeptiden können als theoretische Basis für ein besseres Verständnis der empirischen Spektrum-Struktur-Korrelation von komplexeren und größeren Proteinen herangezogen werden. N-Methylacetamid wird bis heute vielfach verwendet, um ein besseres Verständnis der Amid-Modi von großen Polypeptiden zu erhalten [125]. Auf Basis dieser und weiterer Rechnungen wurden Frequenzen für verschiedene Amid-Banden berechnet, die in der Tabelle 3 zusammengefasst dargestellt sind.

Am häufigsten werden zur Gewinnung der konformativen Informationen mittels IR-Spektroskopie die Amid-I-Bande, Amid-II-Bande und Amid-III-Bande genutzt, wobei die Amid-I-Bande bei der Auswertung der Sekundärstrukturanteile von Proteinen in wässrigen Lösungen am meisten genutzt wird. Die Amid-I-Bande besteht hauptsächlich aus der C = O-Streckschwingung. Diese Streckschwingung ist schwach gekoppelt mit einer in der Bindungsebene erfolgenden N-H-Biegeschwingung und einer C-N-Streckschwingung. Die Frequenz der Amid-I-Bande variiert mit den Wasserstoffbrückenbindungen, an denen die C = O- und N-H-Gruppen eines Proteins beteiligt sind [130].

Tabelle 3: Darstellung der charakteristischen Infrarot-Banden der Peptidbindung nach [131], [132].

Symmetrie	Bezeichnung der Amid-Banden	Wellenzahl (cm ⁻¹)	Zuordnung der Schwingungsformen ^(a)
In-plane (in der Ebene)	A	3300	N-H (v) 100 %
	B	3100	N-H(v) 100 %
	I	1690-1600	C = O (v) 80 %; C-N (v) 10 %; N-H (δ _i) 10 %
	II	1575-1480	N-H (δ _i) 60 %; C-N (v) 40 %
	III	1301-1229	C-N (v) 30 %; N-H (δ _i) 30 %; C = O (δ _i) 10 %; O = C-N (δ _i) 10 %
Out-of-plane (aus der Ebene)	IV	767-625	O = C-N (δ _a) 40 %; andere Schwingungen
	V	800-640	N-H (δ _a)
	VI	606-537	C = O (δ _a)
	VII	200	C-H (τ)

^(a) Abkürzungen: (v) Streckschwingung, (δ_i) Deformationsschwingung in der Ebene der Amidbindung, (δ_a) Deformationsschwingung aus der Ebene der Amidbindung und (τ) Torsionsschwingung

Weiterhin wird zur Strukturuntersuchung die Amid-II-Bande benutzt, welche der N-H-Biegeschwingung ($\sim 60\%$) sowie der C-N-Streckschwingung ($\sim 40\%$) zugeordnet wird. Analog zur Amid-I-Bande wird die Amid-II-Bande in verschiedene, überlappende IR-Anteile unterteilt, welche von der Sekundärstruktur der Proteine verursacht werden [130].

Neben den Schwingungen der Peptidbindung, welche durch die vorgestellten Amid-Banden zu beschreiben sind, werden zusätzlich im IR-Spektrum die Absorptionsbanden der Aminosäure-Seitengruppen detektiert. Einige Aminosäure-Reste insbesondere Asparagin-, Glutamin-, Arginin-, Lysin- und Tyrosin-Reste haben intensive Absorptionen in dem Amid-Spektralbereich, als graumarkierter Bereich in der Tabelle 4 verdeutlicht. Diese Absorptionsbanden der Aminosäure-Seitenketten können zwischen 10 und 30 % zur Gesamtintensität des IR-Spektrums beitragen [133], [134].

Tabelle 4: Spektrale Parameter für Absorptionsbanden Seitenkette in dem $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ -Bereich in H_2O [133].

Aminosäuren	Schwingungsformen ^a	$\nu_0\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\epsilon_0\text{ (M}^{-1}\text{ cm}^{-1}\text{)}$
Asparagin (Amid)	$\nu\text{ (C=O)}$	1678 ± 3	310
	NH	1622 ± 2	160
Glutamin (Amid)	$\nu\text{ (C=O)}$	1670 ± 4	360
	$\delta\text{ (NH)}$	1610 ± 4	220
Arginin (Guanidin)	$\nu_{\text{as}}\text{ (C=N)}$	1673 ± 3	420
	$\nu_{\text{s}}\text{ (C=N)}$	1633 ± 3	300
Lysin (Amin)	$\nu_{\text{as}}\text{ (NH}^+\text{)}$	1629 ± 1	130
Tyrosin (Phenyl)	Ringschwingung	1602 ± 2	160
N-terminierte Gruppe (Amin)	$\nu_{\text{as}}\text{ NH}^+\text{ (NH}_3^+\text{)}$	1631 ± 3	210

^a Abkürzungen: (ν) Streckschwingung, (δ) Deformationsschwingung, (ν_{as}) antisymmetrische und (ν_{s}) symmetrische Streckschwingung

Anhand der in Tabelle 3 aufgeführten Amid-Banden der Peptidbindung und der in Tabelle 4 stehenden Absorptionsbanden der Aminosäuren sind die vielen überlappenden Bandenkomponenten zu erkennen. Um die Analyse der Sekundärstrukturanteile anhand der Schwingungsfrequenzen der Peptidbindung zu spezifizieren, sind bessere Auflösungen der überlappenden Banden notwendig. Zur Auflösung der Überlagerung einzelner Bandenkomponenten der breiten Proteinamid-Banden werden mathematische Methoden herangezogen. Hierzu gibt es zwei Möglichkeiten: die Fourier-Selbstentfaltung (FSD, engl. *Fourier-Self-Deconvolution*) [135], [136] und die Partial-Least-Squares-Methode (PLS) [137], [138].

In dieser Arbeit wird zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile die Software ProteinDynamics (Bruker Optics GmbH) genutzt, welche auf der Partial-Least-Squares-Kalibration beruht. Als Basis der Kalibrierungsmatrix gelten die Sekundärstrukturinformationen aus der Röntgenstrukturanalyse mit insgesamt 43 verschiedenen Proteinspektren. Mit dem Partial-Least-Squares-Verfahren werden nicht nur Amid-I-Banden bei der Interpretation der Proteinspektren, wie dies bei der Fourier-Selbstentfaltungs-Methode der Fall ist, sondern es werden sowohl Amid-I- als auch Amid-II-Banden bei der Kalibrierung genutzt. Insgesamt gesehen weist die IR-Spektroskopie einige Einschränkungen und einige Vorteile gegenüber anderen Messmethoden auf. Trotz dieser Einschränkungen bei der Beurteilung relativer Proteinsekundärstrukturen bietet die IR-Spektroskopie ein gutes Werkzeug für die Untersuchung der strukturellen Veränderungen an Proteinen.

2.5.2 Schwingungsspektroskopie von Proteinen auf Festkörperoberflächen

Zur Charakterisierung von ultradünnen Schichten adsorbierter Proteine an Festkörperoberflächen eignen sich folgende oberflächenanalytische Methoden: Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS, engl. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) [139], Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS, engl. *Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) [139], Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS, engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry*) [139], Chirale Summenfrequenzspektroskopie sowie Rasterkraftmikroskopie (AFM).

Allerdings sind bei einigen Methoden nur ex-situ-Untersuchungen möglich, da für die Erzeugung und Detektion eines analytischen auswertbaren Signals bei einigen Methoden Hochvakuum in der Probenkammer (zum Beispiel bei XPS-Untersuchungen ein Basisdruck von $4 \cdot 10^{-10}$ mbar oder den MALDI-MS-Untersuchungen $6.6 \cdot 10^{-12}$ mbar) erforderlich ist. Es gibt auch oberflächenanalytische Methoden wie die Raman-Schwingungsspektroskopie, sowie die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS), welche in-situ-Untersuchungen von adhäsiven Molekülen ermöglichen.

Die IRRAS-Spektroskopie stellt eine Mischform der Transmissions- und der gerichteten externen Reflexionsinfrarotspektroskopie dar und wurde durch die Pionierarbeiten von Greenler als oberflächenanalytische Methode etabliert [140]. Bei dieser Methode wird p-linear polarisierte IR-Strahlung in streifendem Einfall auf die Probe gelenkt und an der Grenzfläche Luft/Metall-Oberfläche reflektiert. Diese durch die Wechselwirkung der IR-Strahlung mit Materie geschwächte IR-Strahlung führt schließlich zum Erhalt der spektroskopischen Informationen über Adsorbaten an Festkörperoberflächen. Allerdings ist bei Untersuchungen der

Proben mit ultradünnen Schichtdicken von kleiner als 10 nm die Empfindlichkeit dieser oberflächenanalytischen Methode nicht ausreichend [141]. Außerdem benötigt man, um ein akzeptables Signal-zu-Rausch(S/N)-Verhältnis zu erhalten, sehr lange Messzeiten (mehrere Stunden) [142]. Um die Empfindlichkeit der IRRAS-Technik zu verbessern, wurde an der Universität Bordeaux I (Fachbereich I, Natur- und Ingenieurwissenschaften) von Buffeteau et al. [143] die Polarisations-Modulations (PM)-Technik zur Untersuchung der ultradünnen Filme an Festkörperoberflächen entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Technik in Kombination mit externer polarisationsabhängiger Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie eingesetzt, um die für die spezifische Immobilisierung der Proteine erforderlichen Modifikationsschritte an Goldoberflächen im Nanometerbereich sowie die Struktur der immobilisierten Proteine zu untersuchen.

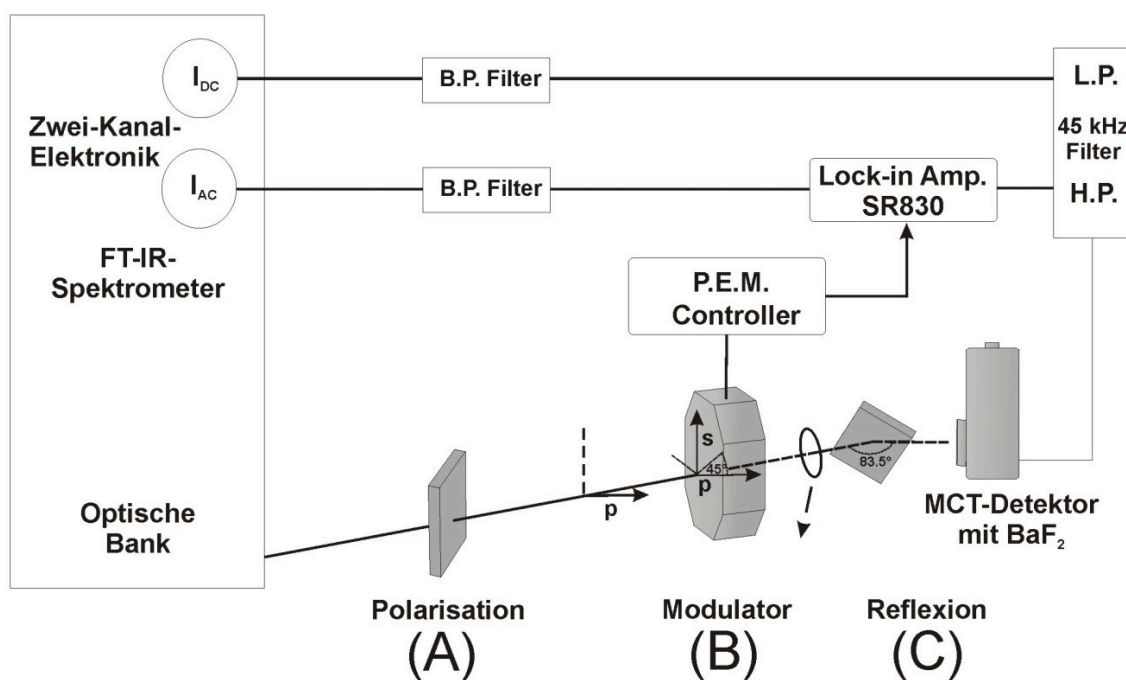


Abbildung 2-19: Schematische Darstellung des optischen Aufbaus und zweikanalige elektronische Verarbeitung der PM-IRRAS-Methode [141].

Um die physikalischen Grundlagen der modulierten Reflexions-Absorptions-Spektroskopie zu verstehen, sollen die optischen Bauteile, die in Abbildung 2-19 durch Buchstaben gekennzeichnet sind, sowie das Verhalten elektromagnetischer Wellen an Grenzflächen und die Reflexion an einer dünnen Adsorptionsschicht in den nächsten Abschnitten näher erläutert werden.

Reflexion und Brechung der elektromagnetischen Wellen an Grenzflächen [144]

Die analytische Aufgabe der PM-IRRAS-Methode ist die Detektion von Erkennungsinformationen der Materialien und strukturellen Informationen an adsorbierten Substanzen. Um bei dieser Informationserhaltung auftretenden optischen Effekten wie Peak-Verschiebung und Verlust der Peak-Symmetrie aus den berechneten Werten eine richtige Stellung zu nehmen und daraus zutreffende Interpretationsaussagen zu erhalten, sollen nachfolgend weitere wichtige Punkte wie Reflexion und das Verhalten der elektromagnetischen Strahlungen an Grenzflächen in Bezug zur PM-IRRAS-Methode näher erläutert werden.

Betrachtet wird die Reflexion und Brechung an isotropen Medien, die richtungsunabhängige physikalische Eigenschaften besitzen. Allgemein breitet sich das Licht in homogenen Medien geradlinig aus. An der Grenzfläche zu einem anderen Medium erfolgt eine Ablenkung an der geradlinigen Bahn. Zur Ablenkung an der gradlinigen Bahn zeigt die Abbildung 2-20, wie eine ebene Welle auf Moleküle aus einem optisch dünneren auf einem optisch dichteren Medium trifft und teils reflektiert und teils gebrochen wird. Dabei liegt die Strecke \overline{AB} parallel zu einer einfallenden Wellenfront, die Strecke \overline{CD} liegt parallel zu einer reflektierten Wellenfront. Durch die Reflexion wird \overline{AB} in \overline{CD} umgewandelt. Ebene Wellen treffen auf Moleküle und werden teils reflektiert, teils gebrochen [144].

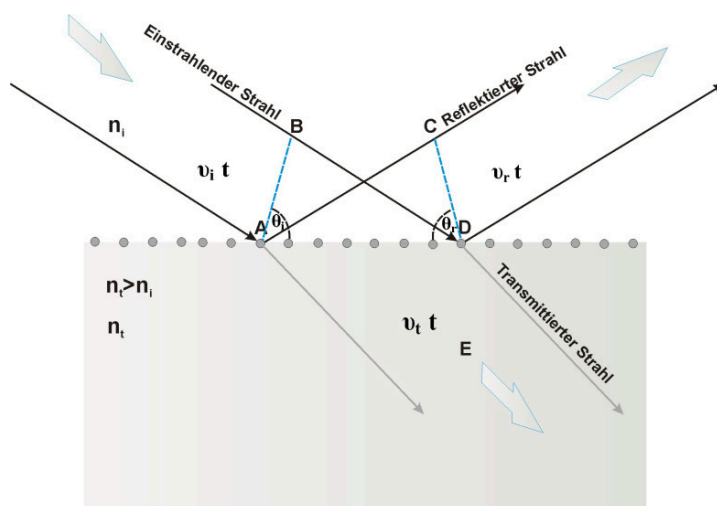


Abbildung 2-20: Ebene Welle an einer Grenzfläche [144].

Bei dieser reflektierenden Umwandlung überlagern die einzelnen Strahlen rückwärts ins Eintrittsmedium gestreuter Elementarwellen einander konstruktiv in einer einzigen Richtung, weil die Wellenlänge der einfallenden IR-Strahlung (mittlerer IR-Bereich) größer als die Abstände zwischen den Molekülen ist. So entsteht ein definierter reflektierter Strahl. Um Punkt D an der Oberfläche zu erreichen, benötigt Punkt B auf der Wellenfront dieselbe Zeit (Δt) wie die von A emittierte Elementarwelle, um Punkt C zu erreichen. Dies bedeutet $\overline{BD} = v_i \Delta t$.

$t = \overline{AC}$ und damit unter Berücksichtigung der obigen Beziehung $\sin \theta_i = \sin \theta_r$, also der Einfallswinkel ist gleich dem Reflexionswinkel [144].

$$\theta_i = \theta_r \quad (2-1)$$

Diese Beziehung in der Gleichung (2-1) bildet den ersten Teil des Reflexionsgesetzes. Somit entspricht der Einfallswinkel von $83,5^\circ$ dem Reflexionswinkel und damit dem Winkel, der bei den PM-IRRAS-Experimenten eingestellt war. In diesem Fall ist von einem streifenden Einfall zu sprechen.

Der zweite Teil des Reflexionsgesetzes besagt, dass der einfallende Strahl, die Flächennormale und der reflektierte Strahl in einer gemeinsamen Ebene – der Einfallsebene – liegen (Abbildung 2-20). Weist die Grenzfläche bestimmte Inhomogenitäten auf, so kommt es nicht nur zu einer Rückwärtsstreuung (in Form des reflektierten Strahls), sondern auch zur Vorwärtsstreuung (in Form des durchgelassenen oder transmittierten Strahls). Der einfallende Strahl ist deshalb von seinem Weg abgelenkt, man bezeichnet diesen Prozess als *Brechung*. Dabei kann man mit der Formulierung des *Snelliusschen Gesetzes* den Winkel der transmittierten Strahlung bestimmen und er ergibt sich aus der *Maxwellschen Theorie* des Elektromagnetismus [144].

$$n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t \quad (2-2)$$

Die Gleichung (2-2) gibt an, dass der einfallende, der reflektierende und der gebrochene Strahl in ein und derselben Ebene, der Einfallsebene, liegen.

Bis jetzt wurden Reflexion und Brechung aus der Sicht der Theorie der Streuung betrachtet. Die Theorie des Elektromagnetismus bietet einen anderen, sogar noch leistungsfähigeren Ansatz. Bei diesem Ansatz zur Beschreibung einer Welle an einer Grenzfläche kann die monochromatische einfallende Welle in folgender Form geschrieben werden [144]:

$$E_i = E_{0i} \cdot \cos(k_i \cdot r - \omega_i t) \quad (2-3)$$

Dabei ist die E_{0i} zeitlich konstant, das heißt, die Welle ist linear polarisiert.

Ohne weitere Annahmen bezüglich der Richtungen, Frequenzen, Wellenlängen, Phasen und Amplituden können die reflektierte und die gebrochene Welle daher wie folgt ausgeschrieben werden:

$$E_r = E_{0r} \cdot \cos(k_r \cdot r - \omega_r t + \varepsilon_r) \quad (2-4)$$

und

$$E_t = E_{0t} \cdot \cos(k_t \cdot r - \omega_t t + \varepsilon_t) \quad (2-5)$$

Dadurch weiß man, welche Beziehung zwischen drei ebenen Wellen $E_i(r, t)$, $E_r(r, t)$ und $E_t(r, t)$ an der Grenzfläche besteht. Nun muss sich an dieser Stelle, um eine quantitative Aussage über die Intensitäten der einfallenden, reflektierten und transmittierten Strahlung zu gewinnen, dem Zusammenhang zwischen den Amplituden E_{0i} , E_{0r} , E_{0t} mithilfe der *Fresnelschen Gleichungen* zugewendet werden. Dabei ist die Polarisationsrichtung des Lichtes zu betrachten, und zwar parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht (p-, Index \parallel), welches nach der Reflexion und Transmission als parallel polarisiert gilt, und senkrecht zur Einfallsebene polarisiertes Licht (s-, Index \perp), welches nach der Reflexion immer noch senkrecht polarisiert ist [144].

$$r_{\perp} = \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{\perp} = \frac{n_i \cdot \cos \theta_i - n_t \cdot \cos \theta_t}{n_i \cdot \cos \theta_i + n_t \cdot \cos \theta_t} \quad (2-6)$$

$$t_{\perp} = \left(\frac{E_{0t}}{E_{0i}} \right)_{\perp} = \frac{2n_i \cdot \cos \theta_i}{n_i \cdot \cos \theta_i + n_t \cdot \cos \theta_t} \quad (2-7)$$

$$r_{\parallel} = \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{\parallel} = \frac{n_i \cdot \cos \theta_i - n_t \cdot \cos \theta_t}{n_i \cdot \cos \theta_i + n_t \cdot \cos \theta_t} \quad (2-8)$$

$$t_{\parallel} = \left(\frac{E_{0t}}{E_{0i}} \right)_{\parallel} = \frac{2n_i \cdot \cos \theta_i}{n_i \cdot \cos \theta_i + n_t \cdot \cos \theta_t} \quad (2-9)$$

r_{\perp} , \parallel ist der sogenannte *Amplituden-Reflexionskoeffizient*, t_{\perp} , \parallel ist der *Amplituden-Transmissionskoeffizient*. Die Gleichungen (2-6) bis (2-9) werden als Fresnel-Gleichungen bezeichnet. Mithilfe dieser Gleichungen kann die Abhängigkeit der Reflexion von der Art der Grenzschicht und der Anzahl von Lagen an Adsorbaten auf Oberflächen, die das IR-Licht passieren, dargestellt werden [144].

Um physikalische Konsequenzen aus den Fresnel-Gleichungen bezüglich der reflektierten Anteile der Amplituden und Flussdichten zu verstehen, wird an dieser Stelle ein kreisförmiges Strahlenbündel betrachtet, das auf eine Oberfläche trifft. Dabei wird die Fläche A mit einer Strahlungsdichte, gemessen in W/m^2 , beleuchtet. Dabei seien I_i , I_r und I_t die Flussdichten des einfallenden, des reflektierten und des gebrochenen Strahls. Die zugehörigen seien $A \cos \theta_i$, $A \cos \theta_r$ bzw. $A \cos \theta_t$. Die einfallende Leistung ist dann gleich $I_i A \cos \theta_i$ – dies ist die Energie, die pro Zeiteinheit von dem Strahl transportiert wird, und daher die Leistung, die auf die Fläche A trifft. Analog ist $I_r A \cos \theta_r$ die Leistung im reflektierten Strahl und $I_t A \cos \theta_t$ die Leistung,

die durch A hindurch transportiert wird. Der Reflexionsgrad beschreibt den Anteil an einfallender Strahlungsintensität, der reflektiert wird, wobei das Quadrat der Fresnel-Koeffizienten die Intensität der Wellen (Reflexionsvermögen) beschreibt. Vorteilhaft ist es, die Komponenten einzeln aufzuschreiben also [144],

$$R_{||} = |r_{||}|^2 \text{ und } R_{\perp} = |r_{\perp}|^2 \quad (2-10)$$

Vereinfacht kann das Reflexionsgrad R geschrieben werden und gibt das Verhältnis der reflektierten zur einfallenden Leistung wieder [144].

$$R = \frac{I_r A \cdot \cos \theta_r}{I_i A \cdot \cos \theta_i} = \frac{I_r}{I_i} \quad (2-11)$$

Optische Eigenschaften von Metallen in der IR-Spektroskopie

In der Reflexions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie werden metallische Substrate verwendet, in welchen die Anwesenheit ungebundener („freier“) Elektronen vorhanden ist, die sich innerhalb des Materials bewegen [144].

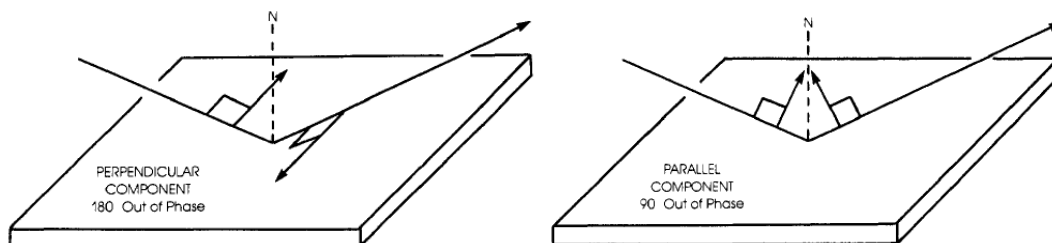


Abbildung 2-21: Schematische Darstellung einer Reflexion an einer Metall-Oberfläche für senkrecht und parallel polarisierte Strahlung zu der Reflexionsebene [145].

Trifft eine elektromagnetische Infrarot-Strahlung mit dem parallel und senkrecht polarisierten elektrischen Anteil auf die Metall-Oberfläche, kommt es durch die Wechselwirkungen des elektrischen Feldes mit in der Oberfläche vorhandenen Ladungen zur Anregung der kollektiven Schwingungen der Ladungsträger, sogenannten Oberflächenplasmonen. Diese sind nichts anderes als Oberflächenwellen, bei denen elektronische Schwingungen parallel zur Oberfläche eines Metalls angeregt werden. Die resultierende elektrische Feldstärke ist im Raum über der metallischen Oberfläche verstärkt. Dieser Effekt wird von einigen Methoden – unter anderem von der Reflexions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie – genutzt, um die Signale von der Oberfläche zu verstärken [146].

Bei Oberflächenplasmonen werden bewegliche Elektronen durch die elektrische Kraft des von außen einwirkenden \vec{E} -Feldes innerhalb des Metalls verschoben. Die Metall-Oberfläche

wird dadurch polarisiert, was dazu führt, dass die Reflexion an einer Metall-Oberfläche bei beiden Komponenten des elektrischen Feldes (d. h. parallel und senkrecht zur Einfallsebene) unter Phasenverschiebungen erfolgt [146]. Die Phasenverschiebung für die beiden Polarisierungen der einfallenden Strahlung ist in der Abbildung 2-21 schematisch dargestellt.

Die senkrecht zu der Reflexionsebene einfallende Strahlung erfährt eine Phasenverschiebung um 180° . Dabei summieren sich die elektrischen Vektoren nahezu zu null, was dazu führt, dass kein elektrisches Feld auf der Oberfläche aufgebaut wird. Die parallel zu der Reflexionsebene gerichtete Feldkomponente erzeugt ein Polarisationsfeld, das dem äußeren Feld gleichgerichtet ist und sich zu diesem addiert (sogenannte stehende Welle) [146].

Die Konsequenz der Phasenverschiebung für die IR-Spektroskopie ist, dass s-polarisiertes Licht destruktiv und p-polarisiertes Licht konstruktiv auf der Oberfläche kombiniert wird. Da sich das s-polarisierte Licht destruktiv auf der Oberfläche verhält, werden dadurch keine oberflächenrelevanten Informationen detektiert. Im Allgemeinen wird nun das p-polarisierte Licht in IRRAS genutzt, um die Detektion von Oberflächeninformationen zu gewährleisten.

Grundlagen der PM-IRRA-Spektroskopie

Die PM-IRRAS funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie IRRAS mit einem einzigen Unterschied in der Ausführung, bei welcher die s- und p-Polarisierung des Lichtes unter Verwendung eines bereits beschriebenen photoelastischen Modulators (PEM) bei einer hohen Frequenz moduliert werden, d. h. abwechselnd in der Zeit erzeugt und auf die Festkörperoberfläche gelenkt werden. Eine typisches experimentelles PM-IRRAS-Set-up ist hervorragend durch Buffeteau beschrieben [141], [147].

Bei einer PM-IRRAS-Messung auf einer dünnen Probe mit einer Dicke d wird das PM-IRRAS-Output-Signal am Ausgang des Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektors (MCT, engl. *Mercury Cadmium Telluride*) elektronisch in zwei Komponententeile zerlegt. Einmal in die zeitunabhängige Komponente I_{DC} (engl. time-dependent signal) oder das sogenannte Gleichstrom-Signal, (Gleichungen (2-12) und (2-13)) und die zeitabhängige Komponente I_{AC} (engl. time-independent signal) oder das sogenannte Wechselstrom-Signal, (Gleichung (2-14)). Diese werden auf zwei Wegen ausgewertet.

Das DC-Signal wird im Wesentlichen durch die unpolarisierte Intensität I_0 abzüglich eines polarisationsabhängigen Anteils bestimmt und mathematisch mit der *Nuller Bessel-Funktion* beschrieben. In der Tat ist die erste zeitunabhängige Komponente einfach zu modulieren durch Fourier-Frequenzen ω_i (Wellengeschwindigkeit für die Charakterisierung der Wellenbewegung), induziert durch die beweglichen Spiegel des FT-IR-Spektrometers [141]:

$$I_{DC} = C_{DC} \cdot I_0^p(\omega_i) \cdot [(R_p(d) + R_s(d)) + (R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_0(\varphi_0)] \quad (2-12)$$

und

$$I_{DC} = C_{DC} \cdot I_0^s(\omega_i) \cdot [(R_p(d) + R_s(d)) + (R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_0(\varphi_0)] \quad (2-13)$$

Die zweite zeitabhängige Komponente hat eine doppelte Modulation mit den Fourier-Frequenzen ω_i , induziert durch den photoelastischen Modulator. Die Trägerfrequenz der ZnSe-Kristallschwingung wird durch $\cos(2\omega t)$ erfasst und durch die zeitabhängige Modulation mittels eines Interferometerspiegels in der Gleichung 2-14 beschrieben [141]:

$$I_{AC} = C_{AC} \cdot I_0^{p,s}(\omega_i) \cdot [(R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_2(\varphi_0) \cdot \cos(2\omega_m t)] \quad (2-14)$$

Wobei $I_0^{p,s}(\omega_i)$ die Intensität p- oder s-polarisierter Infrarot-Strahlung der Frequenz (ω) am Ausgang des Polarisators vor dem PEM ist; R_p und R_s sind polarisierte Reflexionen des Films/Substrates. J_2 und J_0 stellen in der Gleichung die zweite und die nullte Ordnung der *Bessel-Funktion* der maximalen Dephasierung (Demodulation) eines photoelastischen Modulators dar. Die Fouriertransformation dieser Signale sind die gesuchten DC- und AC-Spektren. Nach der Demodulation des AC-Signals mit einem Lock-in-Verstärker ergibt sich aus dem Verhältnis dieser beiden Komponenten die differentielle PM-IRRAS-Absorption [141]:

$$S_{PM-IRRAS} = \frac{I_{AC}}{I_{DC}} = \frac{g | (R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_2(\varphi_0) |}{[(R_p(d) + R_s(d)) \pm (R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_0(\varphi_0)]} \approx \frac{\Delta R}{R} = \frac{(R_p - R_s)}{(R_p + R_s)} \quad (2-15)$$

dabei sind $R_p(d)$ und $R_s(d)$ die Reflexionen des parallel und senkrecht polarisierten Lichtes vom Film/Substrat, d ist die Filmschichtdicke, $J_0(\varphi_0)$ und $J_2(\varphi_0)$ sind nullte und zweite Ordnung der maximalen Dephasierung φ_0 der PEM in der *Bessel-Funktion* und g ist ein Verstärkungsfaktor [142]. In der Gleichung 2-15 beschreiben der Zähler und der Nenner die Differenz und die Summe des p- und s-polarisierten Reflexionsvermögens der (R_p und R_s)

Vorteilhaft bei dieser Oberflächenmethode ist, dass zum einen s-polarisierte IR-Strahlung zur Einfallsebene im Bereich der Grenzfläche des Metalls aufgrund der destruktiven Feldstärke nicht mit den Dipolen von an der Festkörperoberfläche adsorbierten Molekülen wechselwirkt und somit Auskunft über die Bulk-Phase (Gasphase) an der Festkörperoberfläche ermöglicht, während die p-polarisierte IR-Strahlung durch die Wechselwirkungen mit dem Adsorbat die Informationen über die Oberflächenspezies ermöglicht. Und zum anderen ergibt sich ein entscheidender Vorteil gegenüber der klassischen IRRAS-Methode aus der 2-Kanal-

Datenaufnahme durch das Entfallen der Notwendigkeit einer Referenzmessung. Aufgrund diesen aufgelisteten Vorteile ist es möglich, sehr dünne Filme unter in-situ-Bedingungen an Gas-Fest- [148], Luft-Flüssig- [149], [150] und Fest/Flüssig-Grenzflächen eingehend zu untersuchen.

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien

Bayhydrol® A 242

Bezugsquelle: Bayer AG
Bayer MaterialScience
(Leverkusen, Deutschland)

Bei Bayhydrol® A 242 handelt es sich um eine kommerzielle Polyacrylat-Harz-Dispersion (ca. 42 % Acrylat in Wasser). In der Tabelle 5 sind bedeutsame physikalische Kennzahlen von Bayhydrol® A 242 zusammengefasst.

Tabelle 5: Physikalische Kennzahlen des Bayhydrol® A 242 [151].

Eigenschaft	Wert	Maßeinheit	Prüfmethode
OH-Zahl Festharz*	4	%	DIN 53 240
Viskosität bei 23 °C	200 ± 100	mPa s	DIN EN ISO 3219/A.3
pH	7,1 ± 0,7		DIN ISO 976
Dichte bei 20 °C	1,06	g/cm ³	DIN EN ISO 2811

*OH-Zahl stellt ein Maß für den Gehalt an Hydroxylgruppen in organischen Materialien.

Bayhydur® 2570

Bezugsquelle: Bayer AG
Bayer MaterialScience
(Leverkusen, Deutschland)

Bei Bayhydur® XP2570 handelt es sich um ein hydrophiliertes, aliphatisches Polyisocyanat. In der Tabelle 6 sind die physikalischen Kenngrößen zusammengeführt.

Tabelle 6: Physikalische Kennzahlen von Bayhydur[®]XP2570

Eigenschaft	Wert	Maßeinheit	Prüfmethode
NCO-Zahl	20,5 ± 0,5	%	DIN EN ISO 11 909
Viskosität bei 23 °C	3500 ± 800	mPa s	DIN EN ISO 3219/A.3
Dichte bei 20 °C	1,26	g/cm ³	DIN EN ISO 2811

Bayhydur[®]3100

Bezugsquelle: Bayer AG
Bayer MaterialScience
(Leverkusen, Deutschland)

Bei Bayhydur[®]3100 handelt es sich um ein hydrophiliertes, aliphatisches Polyisocyanat. In Tabelle 7 sind die physikalischen Kenngrößen zusammengeführt und müssen bei der Berechnung des Mischungsverhältnisses für die Erzeugung eines PUR-PDMS-Hybrid-Systems einbezogen werden.

Tabelle 7: Physikalische Kennzahlen von Bayhydur[®]3100 [152].

Eigenschaft	Wert	Maßeinheit	Prüfmethode
NCO-Zahl	17,4 ± 0,5	%	DIN EN ISO 11 909
Viskosität bei 23 °C	2800 ± 800	mPa s	DIN EN ISO 3219/A.3
Dichte bei 20 °C	1,16	g/cm ³	DIN EN ISO 2811

BYK-375

Bezugsquelle: Altana AG
BYK Additives & Instruments
(Wesel, Deutschland)

Beim BYK-375 handelt es sich um ein Lösungsgemisch eines polyether-polyestermodifizierten hydroxyfunktionellen Poly(dimethylsiloxans). In Tabelle 8 sind die physikalischen Kenngrößen zusammengeführt.

Tabelle 8: Kennzahlen des BYK-375 [153].

Eigenschaft	Wert
OH-Zahl (Feststoff)	ca. 30 mg KOH/g
Nichtflüchtiger Anteil	25 %
Dichte bei 20 °C	0,98 g/cm ³

(3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS, 96 %)C₆H₁₇NO₃Si; M_r 179,29 g/mol.

Bezugsquelle: ABCR
(Karlsruhe, Deutschland)
CAS-Nr.: [13822-56-5]

(Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPTMS, 95 %)C₆H₁₆O₃SSi; M_r 196,34 g/mol.

Bezugsquelle: ABCR
CAS-Nr.: [4420-74-0]

(Triethoxysilyl)undecanal (TESU, 90 %)C₁₇H₃₆O₄Si; M_r 332,55 g/mol.

Bezugsquelle: ABCR
CAS-Nr.: [116047-42-8]

1,5-Pentandial-Lösung (25 %)C₅H₈O₂; M 100,12 g/mol.

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich
(Steinheim, Deutschland)
CAS-Nr.: [111-30-8]

2-Propanol (99,5 %)C₃H₈O; M_r 60,1 g/mol.

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich
CAS-Nr.: [67-63-0]

Natriumcyanoborhydrid (5.0 M in 1M NaOH)NaBH₃CN; M_r 62,84 g/mol.

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich
CAS-Nr.: [25895-60-7]

Essigsäure (≥99,7)C₂H₄O₂; M_r 60,05 g/mol.

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich
CAS-Nr.: [64-19-7]

Meerrettichperoxidase (HRP)M_r 40.000 g/mol.

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich
CAS-Nr.: [9003-99-0]
EC 1.11.1.7

Methanol (≥99,9 %)CH₄O; M_r 32,04 g/mol.

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich
CAS-Nr.: [67-56-1]

Ethanol (96 %) $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$; M_r 46,07 g/mol.**Bezugsquelle: Sigma-Aldrich****CAS-Nr.: [64-17-5]****Triethylamin (TEA, 99,5 %)** $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$; M_r 101,19 g/mol.**Bezugsquelle: Sigma-Aldrich****CAS-Nr.: [121-44-8]****Natriumhydrogencarbonat (≥ 99.9 %)** NaHCO_3 ; M_r 84,01 g/mol.**Bezugsquelle: Sigma-Aldrich****CAS-Nr.: [144-55-8]****Natriumdihydrogencarbonat (≥ 99 %)** Na_2CO_3 ; M_r 105,99 g/mol.**Bezugsquelle: Sigma-Aldrich****CAS-Nr.: [497-19-8]****1-Step Ultra TMB-ELISA****TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)** $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$; M_r 240,35 g/mol.**Bezugsquelle: Thermo scientific****CAS-Nr.: [54827-17-7]****Natriumhydrogenphosphat** Na_2HPO_4 ; M_r 146,96 g/mol.**Bezugsquelle: Merck KGaA
(Darmstadt, Deutschland)****CAS-Nr.: [7558-79-4]****Kaliumdihydrogenphosphat** KH_2PO_4 ; M_r 136,09 g/mol.**Bezugsquelle: Merck AG****CAS-Nr.: [7778-77-0]****Au/SiO₂-Wafer**

Durchmesser 100 mm; Ausrichtung P/Bor <100>; Dicke 525 ± 25 μm ; einseitig poliert; 200 nm Gold; Ti als Haftvermittler zwischen Gold und Silizium.

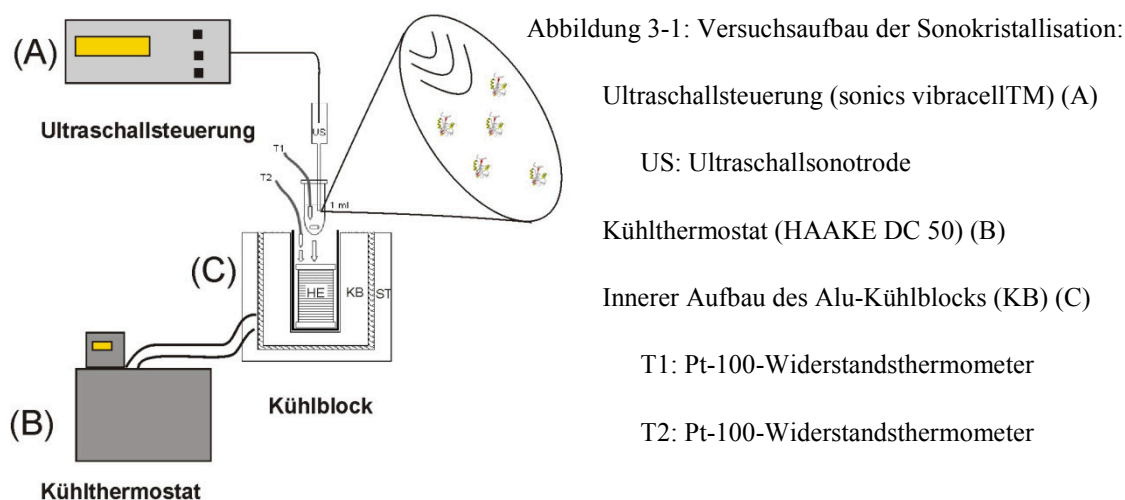
**Bezugsquelle: Silicon Materials
(Kaufering, Deutschland)****Anti-Frost-Protein (AFP) Typ III** M_r 7024,34 g/mol.**Bezugsquelle: A/F Protein
(Waltham, USA)****CAS-Nr.: nicht vergeben**

3.2 Experimente mit Proteinen in Lösung

3.2.1 Messung der thermischen Hysterese mittels Sonokristallisation [154]

Im Folgenden werden die Kalibriervorschriften und Messvorschriften für die am Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (IFAM) neu entwickelte Messvorrichtung zur Bestimmung der thermischen Hysterese der Anti-Frost-Proteine unter Nutzung von Ultraschall erläutert.

Mithilfe dieser Methode ist es möglich, den kompletten Abkühlungs-, Gefrier-, Erwärmungs- und Schmelzprozess in einer einzigen Messkurve elektronisch aufzunehmen und durch den Kurvenverlauf einen sehr genauen Aufschluss über die thermische Hysterese zu erhalten.



Zur Abkühlung des Kühlblocks dient das externe Kühlwasserbad (HAAKE K15) mit der Kühlflüssigkeit (Ethanol/Wasser-Gemisch). Diese Kühlflüssigkeit wird durch den Kühlthermostaten (HAAKE DC 50) mit der Pumpleistung 300 L/17 min in dem Kühlblock zirkuliert. Nach einer Stunde Zirkulation wird der Kühlblock auf $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert. Als Aufnahmeeinrichtung für die Heizeinheit dient eine Kunststoffröhre, welche in das Innere der Heizeinheit zur Messung versenkt wird. Die Heizeinheit besteht aus einem Kupferdraht mit einem elektrischen Widerstand von $9\text{ }\Omega$. Die Energiezufuhr für die Heizeinheit erfolgt über ein regelbares Netzteil von Delta Elektronik (Zierikzee, Niederlande). Zusätzlich enthält die Kupferspule ein freies Aufnahmevolumen für die Einführung des 2 mL Polyethylen-Reaktionsgefäßes, in welchem sich die zu untersuchende Proteinlösung befindet. Außerdem werden in dem Reaktionsgefäß einmal ein Pt-100-Widerstandsthermometer T1 von JUMO (Fulda, Deutschland) zur Aufnahme der Temperatur in der Proteinlösung während der Messung und einmal ein Pt-100-Widerstandsthermometer T2 zur Kontrolle der Temperatur der Heizeinheit platziert.

Die Temperaturen von T1 und T2 werden mithilfe des Multimeters Almemo 2390-3 (Ahlborn, Deutschland) aufgenommen und an ein Messprogramm zur Datenerfassung übermittelt. Die Vorteile der Ultraschallmethode liegen in der im Vergleich zum Clifton Nanoliter Osmometer schnellen Produzierbarkeit der Ergebnisse sowie der guten Reproduzierbarkeit des Kristallisationsprozesses. Daher eignet sich diese Methode gut als Screening-Methode nicht nur bei der Bestimmung der thermischen Hysterese von Anti-Frost-Proteinen oder synthetisch hergestellten Anti-Frost-Peptiden, sondern auch bei der Untersuchung von Standard-Gefrierschutzmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO).

3.2.1.1 Kalibrierung der Messvorrichtung [154]

Für die Überprüfung der Zuverlässigkeit der Messvorrichtung erfolgt zunächst die absolute Kalibrierung bei einem Gefrierpunkt von 0 °C mit bidestilliertem Wasser (Qualität: 2 MΩ cm aus Purelab UHQ II ELGA). Hier wurden jeweils 1 mL bidestilliertes Wasser in ein 2 mL Eppendorfröhrchen (Material: Polypropylen) pipettiert. Nach der Befüllung des Eppendorfröhrchens wird dieses mit einem Korken (Material: Polystyrol) verschlossen, in welchem eine Öffnung in der Mitte angebracht ist. Durch diese Öffnung wird der Pt-100-Widerstandsthermometer (Kabel mit Glasspitze) in ein Eppendorfröhrchen hineingeführt, so dass der gläserne Pt-100-Widerstandsthermometer in der Lösung ist. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der Widerstandsthermometer nicht zu tief in die Lösung eingetaucht wird, weil dieser sonst beim Rühren der zu messenden Lösung mit dem Rührfisch in Kontakt kommt. Dies würde zu einer enorm großen Temperaturschwankung führen. Dann wird das Eppendorfröhrchen mit dem Widerstandsthermometer zusammen in die Kupferspule hineingeführt. Anschließend wird die Kupferspule mit dem Widerstandsthermometer zusammen in die Öffnung des Alu-Kühlblocks geführt. Nachfolgend wird nun vorsichtig noch der Ultraschallgeber in das Eppendorfröhrchen mit dem Widerstandsthermometer durch den Korken navigiert bis er mit der Spitze in die Lösung eingetaucht ist. Zum Schluss wird der Alu-Kühlblock mit einer Styroporabdeckung verschlossen. Die Vorbereitung der Messung wäre damit abgeschlossen.

Nach der absoluten Kalibrierung bei einem Gefrierpunkt von 0° C mit VE-Wasser erfolgte eine weitere Kalibrierung unter Verwendung von Osmolality Linearity Set durch die Messung des Gefrierpunktes. Zu diesem Zweck erfolgten die Messungen genauso wie die Messungen der absoluten Kalibrierung mit jeweils 1 mL Osmolality-Lösung der verschiedenen Lösungskonzentrationen 100 mOsm/kg, 500 mOsm/kg, 900 mOsm/kg, 1500 mOsm/kg und 2000 mOsm/kg in der 2 mL Eppendorfröhrchen. In diesem Zusammenhang ermöglicht das

Osmolality Linearity Set eine vergleichende Gefrierpunktsbestimmung für die erwarteten und tatsächlichen Messwerte. Sowohl mit VE-Wasser als auch mit jeder Lösungskonzentration des Osmolality Linearity Sets werden mehrere Messungen durchgeführt und Daten aufgenommen.

3.2.1.2 Untersuchung der Funktionswirkung des AFP

Vor der Messung der nicht-kolligativen Gefrierpunktserniedrigung des AFP Typ III werden zunächst Pufferlösungen, in denen die Anti-Frost-Proteine gelöst werden, getestet. Der Puffer bestand aus 0,201 g (1,48 mmol) KH_2PO_4 und 1,517 g (8,52 mmol) Na_2HPO_4 mit bidestilliertem Wasser (Qualität des Wassers 2 M Ω cm) auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert bei dem frisch angesetzten Phosphatpuffer lag bei 7,4 und hatte eine elektrische Leitfähigkeit von 0,00173 $\Omega^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$.

Für die Messung wurden jeweils 1 mL Phosphatpuffer-Lösung mit der zu untersuchenden Proteinlösung in ein 2 mL Eppendorfröhrchen (Material: Polypropylen) pipettiert. Der Nachweis, dass die thermische Hysterese mit dieser Messvorrichtung feststellbar ist, soll durch die unterschiedlichen Konzentrationen an AFP Typ III von 3 mg/mL, 5 mg/mL und 7 mg/mL getestet werden und mit Messwerten anderer Messmethoden verglichen werden.

3.2.1.3 Untersuchung des pH- und des Temperatur-Einflusses

Untersuchung des Temperatureffektes auf AFP Typ III erfolgte indem eine Proteinlösung mit einer Massenkonzentration von 3 mg/ 1 mL in einem 10 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 angesetzt und in eine 2 mL Eppendorfröhrchen (Material: Polypropylen) überführt wurde. Diese Proteinlösung wurde auf einem Minishaker MS2 (IKA) bei einer Frequenz von 500 min^{-1} für 5 min geschüttelt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf einem Eppendorf Thermomixer comfort 1,5 mL bei 600 Umdrehungen pro Minute“ (UpM) bei einer steigenden Temperatur von 11 °C, 30 °C, 40 °C und 50 °C über eine Zeitdauer von 30 Minuten behandelt. Bei einer Temperatur von 50 °C fand eine Agglomeration des AFP Typ III statt.

Nach der thermischen Behandlung wurden die Proteinlösungen für ca. 30 min. in einem Reaktionsgefäßgestell unter Raumbedingungen gelagert. Anschließend wurde die Messvorrichtung mit den thermisch behandelten Proteinlösungen beladen und die Aktivität des thermisch behandelten AFP Typ III mittels Sonokristallisation getestet. Im Anschluss wurde die sekundäre Veränderung des thermisch behandelten AFP Typ III mittels Schwingungsspektroskopie unter Verwendung der AquaSpec-Durchflusszelle durchgeführt. Eine präzise und vollständige experimentelle Beschreibung der Durchführung einer Messung mittels der

AquaSpecTM-Durchflusszelle als auch die Spektrenanalyse von Proteinen ist in der Arbeit von P. Wand [155] zu finden.

Zur Untersuchung des pH-Effektes auf AFP Typ III wurden zwei Stammlösungen KH_2PO_4 mit einem pH = 4,8 und Na_2HPO_4 mit dem pH = 9,0 angesetzt. Unter Nutzung dieser Stammlösungen ohne weitere Salzzusätze wurden die pH-Werte 5,2, 6,2, 7,4 und 8,2 eingestellt. Anschließend wurden jeweils 3 mg AFP Typ III auf der Mikrowaage eingewogen und in der zu untersuchenden Pufferlösung mit jeweils 1 mL gelöst. Anschließend wurden die Proteinlösungen auf die nicht-kolligative Gefrierpunktserniedrigung untersucht.

3.2.2 Messung der thermischen Hysterese mittels DSC

Vor jeder Messung wurde das DSC-Gerät (PYRYS Diamond) für den Temperaturbereich (278,15 - 303,15) K unter Verwendung von Wasser ($T_{\text{mH}_2\text{O}} = 273,15 \text{ K}$) (Merck-Darmstadt Lot/Filling code 1332792) und n-Decan ($T_{\text{m-n-Decan}} = 245,15 \text{ K}$) (Merck-Darmstadt: Lot/Filling code K35437903904) gegen den Referenztiegel kalibriert. Dabei wurden die Kalibrierungssubstanzen mit einem Gewicht von 0,9800 mg an Wasser und 3,210 mg n-Decan auf einer Mikrowaage 4503 (Sartorius) in einen tarierten, im Ultraschall gereinigten Aluminiumtiegel (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) eingewogen. Anschließend wurden die Aluminiumtiegel mit einem Deckel (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) mithilfe einer Universalverschlusspresse (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) verschlossen und nach dem Erreichen der Ladetemperatur von 278,15 K mittels Standard-Pan-Manipulator in die Messzelle gebracht. Danach erfolgte die Temperaturkalibrierung mit Anwendung des folgenden Programms: 1) Hold for 5 min at 5 °C; 2) Cool from 5 °C to -30 °C at 5 °C/min; 3) Hold for 5 min at -30 °C; 4) Heat from -30 °C to -5 °C at 5 °C/min; 5) Heat from -5 °C to 5 °C at 1 °C/min.

Nach der Kalibrierung wurden dieselben Massenkonzentrationen an AFP Typ III (3 mg/mL, 5 mg/mL und 7 mg/mL) untersucht und mit Resultaten aus der Sonokristallisation verglichen. Zur Kontrolle der Verlässlichkeit des Gerätes wurde das Lysozym mit derselben Stoffmengenkonzentration von 0,43 mmol/L wie AFP Typ III gemessen. Anschließend wird die angesetzte Proteinlösung mit jeweils ca. 2,0 mg auf einer Mikrowaage in einen tarierten Aluminiumtiegel eingewogen, verschlossen und nach dem Erreichen der Ladetemperatur von 278,15 K mit einem Standard-Pan-Manipulator in die Messzelle eingebracht. Die Probe wurde dabei von der Temperatur 278,15 K (Starttemperatur) auf eine Temperatur von 303,15 K mit einer Kühlgeschwindigkeit 3,00 °C/min gekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur fährt das Programm das Gerät auf die zu untersuchende Haltetemperatur (T_h) mit einer Geschwindigkeit von 3,00 °C/min und hält anschließend das System 5 Minuten lang auf dieser Temperatur.

Während dieser Haltezeit wurde die Probe nicht vollständig aufgeschmolzen, so dass eine bestimmte Menge an Eiskristallen im geschlossenen System blieb. Danach wurde die Proteinlösung mit einer Kühlgeschwindigkeit von 3,00 °C/min auf die Temperatur von -30 °C zurückgekühlt. Dabei wurde die Onset-Temperatur (T_o) bei der Wiederkristallisation aufgenommen.

3.3 Experimente mit Proteine an Oberflächen

3.3.1 Spezifische Immobilisierung von HRP auf einer Polyurethanoberfläche

3.3.1.1 Präparation des PUR-Systems und O₂-Plasmaaktivierung

Um eine Polyadditionsreaktion des Polyurethans zu starten und danach einen gut ausgehärteten Film mit einem möglichst hundertprozentigen Umsatz zu erhalten, wurden das Polyol und Polyisocyanat im Verhältnis 1:1 vermischt. Den Berechnungen zufolge wurden dann 5,0 g Bayhydrol[®] A242 und 1,0 g Bayhydrol[®] XP2570 in einen Speedmixer-Becher (Material: Polypropylen) eingewogen. In diesem Mischungsverhältnis liegen rein rechnerisch keine freien reaktiven Gruppen in dem System vor. Nach dem Dispergieren wurde die Beschichtung auf einem Coil-Coating-Blech unter Verwendung eines Kastenrakels mit einer Nassfilmschichtdicke von 100 µm aufgebracht. Die Filme wurden unter Raumbedingungen im Exsikkator für 12 Stunden belassen. Anschließend wurden die Proben in einen Ofen für 3 Stunden bei 60 °C platziert, um die Polymerisation zwischen den Polyolen und Polyisocyanaten zu vervollständigen.

Als Nächstes erfolgte die O₂-Plasmaaktivierung mittels Atmosphärendruck-Plasmadüsen (Plasmajet-Verfahren) von Plasmatrete GmbH (Steinhagen, Deutschland). Das gesamte Atmosphärendruckplasma (AD-Plasma) besteht aus einem 230-V-Netzteil (PSU), einem Transformator, einer Gasversorgung und dem Plasmastrahl. Bei dieser O₂-Aktivierung wurde der Plasmastrahl mit Sauerstoff als Prozessgas bei einer Fließgeschwindigkeit von 40 L/min für eine Behandlungsdauer von 20 min in einem Abstand von 8 mm und einem Zeilenabstand von 20 mm in zwei Zyklen.

3.3.1.2 Präparation des PUR-PDMS-Hybrids und Druckluft-Plasmaaktivierung

Bei der Präparation des PUR-PDMS-Hybrid-Systems reagieren Polyol mit Polyisocyanat im Verhältnis 1:1, um einen gut ausgehärteten Film mit einem möglichst hundertprozentigen Umsatz zu bekommen. Den Berechnungen zufolge wurden 4,2 g Bayhydrol[®] A242 und 1,0 g Bayhydrol[®] 3100 in einen Speedmixer-Becher (Polypropylen) eingewogen. In diesem Mi-

schungsverhältnis liegen rein rechnerisch keine freien reaktiven Gruppen in dem System vor. Zu dieser Formulierung wurden anschließend 3 % (w/w), bezogen auf die gesamte Mischung, hydroxyfunktionelles Poly(dimethylsiloxan) mit dem Handelsnamen BYK-375 eingewogen. Diese Mischung wurde anschließend mit einem Dissolver (Dispermat VMA Getzmann GmbH, Reichshof, Deutschland) bei einer Umdrehungszahl von 500 UpM für 30 Minuten dispergiert. Vor der Dispersion wurde die Polyisocyanat-Komponente noch mit Methyl-tert-butylether (MTBE) verdünnt.

Nach dem Dispergieren wurde die Beschichtung auf einem Coil-Coating-Blech unter Verwendung eines Kastenrakels mit einer Nassfilmschichtdicke von 100 μm aufgebracht. Die Filme wurden unter Raumbedingungen im Exsikkator für 12 Stunden belassen. Anschließend wurden die Proben in einen Ofen für 3 Stunden bei 60 °C platziert, um die Polymerisation zwischen den Polyolen und den Polyisocyanaten zu vervollständigen. Schließlich wurde die Polyurethan-Beschichtung mit der PDMS-Separationsschicht mit Atmosphärendruck-Plasma-Jet-System von Plasmatrete GmbH (Steinhagen, Deutschland) behandelt. Das gesamte AD-System besteht aus einem 230-V-Netzteil (PSU), einem Transformator, einer Gasversorgung und dem Plasmastrahl. Bei dieser Aktivierung wurde der Plasmastrahl mit Druckluft bei einer Fließgeschwindigkeit von 33 L/min für die Behandlungsdauer von 10 m/min und bei einem Abstand von 4 mm in vier Zyklen betrieben.

3.3.1.3 Silanisierung mittels (3-Aminopropyl)trimethoxysilan

Nachdem die reine PUR-Beschichtung mit O₂-Plasma und PUR-PDMS-Beschichtung mit Druckluft-Plasma aktiviert wurde, wurde die Silanisierung durchgeführt.

Bei den O₂-plasmaaktivierten Proben wurde folgende vorhydrolysierte (3-Aminopropyl)trimethoxysilan-Lösung verwendet. Die Vorhydrolyse des (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) erfolgte nach folgendem Versuchsprotokoll: Es wurden 5 %-(v/v) an APTMS mit 25 mL Toluol als Lösungsmittel sowie 50 μL an 1,8-Diazabicyclo[5.4.0] undec-7-en als Katalysator für die Hydrolyse- und Kondensationsreaktion versetzt und 30 Minuten auf dem Magnetrührer bei 250 UpM gerührt. Die Reaktionslösung wurde immer vor dem Gebrauch frisch angesetzt. Die O₂-plasmaaktivierten Proben wurden in die mit reaktiver Silan-Lösung gefüllte Kristallisierschale für eine Inkubationszeit von 30 Minuten gegeben. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die mit Silan behandelten PUR-Proben in die mit Toluol gefüllte Kristallisierschale überführt und 5 min auf dem Orbitalschüttler mit einer Schüttelfrequenz von 200 min⁻¹ geschüttelt. Nachfolgend wurden die Proben bei 100 °C im Ofen eine Stunde getrocknet.

Für die druckluft-plasmaaktivierten PUR-PDMS-Proben wurde folgende vorhydrolysierte (3-Aminopropyl)trimethoxysilan-Lösung verwendet. Die Vorhydrolyse des (3-Aminopropyl)trimethoxysilans (APTMS) erfolgte nach folgenden Versuchsprotokoll: 1,0 mL APTMS und 5 mL 2-Propanol wurden in einem 250 mL Propylenbecher auf einem Magnetrührer vorgelegt. Anschließend wurden 5 mL an 0,1 M Essigsäure ($\text{pH} = 4$) über eine 25-mL-Tropfbürette langsam unter Rühren bei 250 UpM zu der aus APTMS und 2-Propanol bestehenden Mischung unter dem Abzug hinzugefügt. Danach wird diese Mischung zwei Stunden bei 500 UpM gerührt. Nach dem Rühren wurden 89 mL 2-Propanol zu der Mischung gegeben. Die NMR-spektroskopischen Ergebnisse zur Hydrolyse von (3-Aminopropyl)trimethoxysilan sind den Quellen [156], [157] zu entnehmen.

Die frisch angesetzte vorhydrolysierte Silan-Lösung ($\text{pH} = 10,8$) wurde daraufhin auf die O_2 -plasmaaktivierte PUR-Beschichtung sowie auf die druckluft-plasmaaktivierte PUR-PDMS-Beschichtung aufgegeben und in einem Ofen für eine Stunde einer Temperatur von $100\text{ }^\circ\text{C}$ für die Kondensations- und Hydrolysereaktion ausgesetzt [54].

3.3.1.4 Immobilisierung von HRP unter Verwendung von Glutaraldehyd

Nach der Silanisierung wird die aminosilanisierte PUR-PDMS-Beschichtung in eine mit der 5 % (v/v)-Lösung Glutaraldehyd (GTA) gefüllte Kristallisierschale für eine Behandlungszeit von 12 h gegeben. Der Glutaraldehyd ist ein homobifunktionelles Kopplungsreagenz [158], welches bei der chemischen Immobilisierung von Biomolekülen an aminosilanisierten und somit aminofunktionalisierten Festkörperoberflächen eingesetzt wird und in den folgenden Arbeiten detailliert beschrieben wurde: [159], [160], [161].

Die 5 % (v/v) Glutaraldehyd-Lösung wurde aus 100 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 angesetzt [162]. Nach einer Behandlungszeit von 6 h wurden 5 M Natriumcyanoborhydrid zu der Glutaraldehyd-Lösung zur reduktiven Aminierung gegeben und weitere 6 Stunden inkubiert [163]. Nach der gesamten Behandlungszeit von 12 h wurden die Proben direkt in eine Lösung des zu immobilisierenden Enzyms HRP (2 mg HRP/30 mL in 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4) für 14 Stunden gestellt. Nach 14 Stunden Inkubation wurden die Proben dreimal mit je 30 mL Phosphatpuffer und 30 mL VE-Wasser unter Verwendung eines Rundschüttlers bei einer Schüttelfrequenz von 150 min^{-1} gespült.

3.3.1.5 Untersuchung der katalytischen Aktivität der immobilisierten HRP

Die Untersuchung der katalytischen Aktivität der immobilisierten HRP auf der PUR-PDMS-Oberfläche wird durch die Messung der Farbentwicklung unter Nutzung des TMB-ELISA-

Substrats realisiert. Dazu wird auf das Coil-Coating-Metallblech mit dem PUR-PDMS-System ein Tropfen mit einem Volumen von 50 μl an 1-Step Ultra-TMB-ELISA mittels einer 100 μl Eppendorf-Pipette gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 15 Minuten inkubiert.

Dabei wandelt sich das farblose TMB-Substrat in ein blaugefärbtes Radikal-Kation um. Anschließend wurde durch die Zugabe von 50 μl 2M H_2SO_4 die katalytische Reaktion unter Ausbildung des Diimins gestoppt. Danach wurde das gesamte Lösungsvolumen von ca. 100 μl von der zu untersuchenden Festkörperoberfläche mit immobilisierten Enzymen mit einer 100 μl Eppendorf-Pipette aufgenommen und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (8x12 mm) gegeben. Nachfolgend wurde die gelbgefärbte Diimin-Lösung bei 450 nm mithilfe eines Mikroplatten-Lesegerätes Mithras LB 940 gelesen. Bei der Absorptionsmessung wurde die Lampenenergie auf 30.000 gesetzt und die Zählzeit betrug dabei 0,10 Sekunden.

3.3.2 Spezifische Immobilisierung von HRP auf der Goldoberfläche

3.3.2.1 Anbindung von (Mercaptopropyl)trimethoxysilan auf der Goldoberfläche

Vor jeder Anbindung wurde eine 20 mM MPTMS-Methanol-Lösung (78,53 μL MPTMS in 19,92 mL Methanol) frisch angesetzt, um Beeinträchtigungen des Anbindungsprozesses durch mögliche Alterung der Thiol-Moleküle in der Lösung zu unterbinden, und in eine gut verschließbare Kristallisierschale gegeben. Die gereinigten Au/SiO₂-Wafer wurden zum Beschichten mit MPTMS in diese mit MPTMS-Methanol-Lösung bei Raumtemperatur überführt. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden Au/SiO₂-Substrate vorsichtig mit einer gereinigten Pinzette aus der Kristallisierschale entfernt und mittels eines Rundschüttlers bei einer Schüttelfrequenz von 100 min^{-1} mit Methanol gespült. Für die anschließende IR-spektroskopische Untersuchung wurden die Proben unter einem Stickstoffstrom (1 bar) (Reinheitsgrad 4.8) für wenige Minuten getrocknet. Um Kontaminationen aus der Laborluft zu unterbinden und eine Oxidation der Thiolat-Schichten zu minimieren, wurden die Proben in einem bei 200 mbar evakuierten Exsikkator gelagert. Anschließende Hydrolyse und Kondensationsreaktionen der MPTMS-Schichten auf den Au/SiO₂-Substraten wurden bei einer Temperatur von 80 °C durch das Eintauchen in 0,1 M HCl-Lösung für 1 h, 2 h, 3 h durchgeführt [65], [67]. Danach wurden die dadurch mit HCl-Lösung behandelten Proben zuerst mit VE-Wasser gespült, anschließend im Stickstoffstrom für 1 Minute getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in den evakuierten Exsikkator bei 200 mbar überführt.

3.3.2.2 Anbindung von (Triethoxysilyl)undecanal

Die selektive Funktionalisierung der hydrolysierten MPTMS-Schicht mit einem aldehydfunktionalisierten (Trimethoxysilyl)undecanal-Silanmolekül wurde in Anlehnung an die Arbeit von Ibarlucea et al. [164] und an die Arbeit von Seitz [165] durchgeführt.

Zunächst wurde vor jeder Anbindung eine 10 mL 96 %-Ethanol-Lösung aus 200 μL TESU und 100 μL Triethylamin (TEA) angesetzt. Die mit MPTMS vorpräparierten Proben wurden aus dem Exsikkator vorsichtig mit einer gereinigten Pinzette in die mit TESU-Lösung gefüllte Kristallisierschale zur Inkubation überführt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumbedingungen wurden die Proben in eine mit Ethanol gereinigte Kristallisierschale überführt und 10 Minuten bei 100 min^{-1} mit Rundschüttler geschüttelt. Nach der Spülprozedur wurden die Proben einer Temperatur von $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 h im Ofen ausgesetzt. Schließlich wurden die nach diesem Protokoll präparierten und somit aldehydfunktionalisierten Proben bis zur weiteren Verwendung im Exsikkator bei 200 mbar gelagert.

3.3.2.3 Immobilisierung von HRP und AFP Typ III

Vor der Immobilisierung wurde eine Proteinlösung mit einer Massenkonzentration von 2,0 mg/10 mL in einer 0,05 M Carbonatpuffer-Lösung ($\text{pH} = 9,6$) angesetzt. Zum Lösen der Proteine in Carbonatpuffer wurden die Proteinlösungen auf dem Minishaker MS2 mit der Schüttelfrequenz von 500 min^{-1} ca. 2 Minuten lang geschüttelt. Im Anschluss wurden die aldehydfunktionalisierten Au/SiO₂-Proben mit der Proteinlösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 6 h bei Raumtemperatur wurde zur reduktiven Aminierung 800 μL 5 M Natriumcyanoborhydrid zu der Proteinlösung gegeben. Nach der Inkubationszeit von 2 h wurden die Proben zunächst einmal mit 0,05 M Carbonatpuffer ($\text{pH} = 9,6$) und schließlich 2 h mit VE-Wasser auf dem Rundschüttler bei 100 min^{-1} gespült.

3.3.2.4 Untersuchung der Aktivität der immobilisierten HRP und AFP

Die katalytische Aktivität der spezifisch und unspezifisch immobilisierten HRP wurde über die Oxidation des farblosen Chromogens 3,3',5,5'-TMB-diamin zum 3,3',5,5'-TMB-diimin, wie bereits im Kapitel 3.3.1.5 beschrieben, untersucht.

Die Untersuchung der Frostschutzeigenschaften des auf Au/SiO₂-Wafer spezifisch sowie unspezifisch immobilisierten Anti-Frost-Proteins Typ III erfolgte in dieser Arbeit mithilfe der am IFAM entwickelten Klimakammer durch den Reiftest. Vor jeder Untersuchung der Proben wurden hierzu mittels Dummy kontrollierbare Bedingungen erzeugt, welche eine Reifbildung auf Oberflächen zur Folge haben. Somit wird zunächst ein Dummy auf einem durch Kryostat

gekühlten Probenhalter mit den Maßen von 49 x 79 mm durch Verschraubung im Winkel von 45 ° zum an der Halterung vorbeiziehenden Luftstrom fixiert. Im Anschluss wurde zur Überwachung der Oberflächentemperatur des Dummys in der Mitte der Kryostatplatte ein Oberflächen-Temperaturmagnetfühler (NiCr-Ni mit einem Temperaturbereich von -65 °C bis 250 °C) platziert und an das Digital-Präzisions-Feuchte-, Strömungs-, Temperaturmessgerät (GMH 3350, Greisinger electronic GmbH) angeschlossen. Anschließend wurden die Rahmenbedingungen in der Klimakammer für die Bereifung von Proben wie folgt festgelegt: Der an den Proben vorbeiziehende Luftstrom muss eine relative Luftfeuchte von 88 % und eine Geschwindigkeit von 9 m/s haben. Die Kryostattemperatur zur Kühlung der Probe muss an die Wärmeleitfähigkeit der Substrate angepasst werden, um eine Vorlauf-Substrattemperatur beim Dummy nach 1 h zwischen -4 °C und -5 °C zu erreichen [166]. Bei dem eigentlichen Bereifungstest mit dieser Vorlauf-Oberflächentemperatur stellt sich dann eine Substrattemperatur zwischen -1,5 ° und -2 °C ein, um die Ergebnisse der untersuchten Proben untereinander zu verifizieren. Nach einer Anlaufzeit von 1 Stunde wird der Dummy aus der Halterung entfernt und die zu untersuchende Probe auf der Kryostatplatte mit dem NiCr-Ni-Oberflächentempersensor, zur Aufzeichnung der Oberflächentemperatur während des Tests, fest verschraubt. Nach 20 Minuten erfolgte die Bewertung mittels einer Messung der Reifschichtdicke anhand des in der Abbildung 3-2 A dargestellten Messkamms. Im Anschluss wurde der Reif-Adhäsions-Test mittels Kraftprüfung vorgenommen (Abbildung 3-2 B).

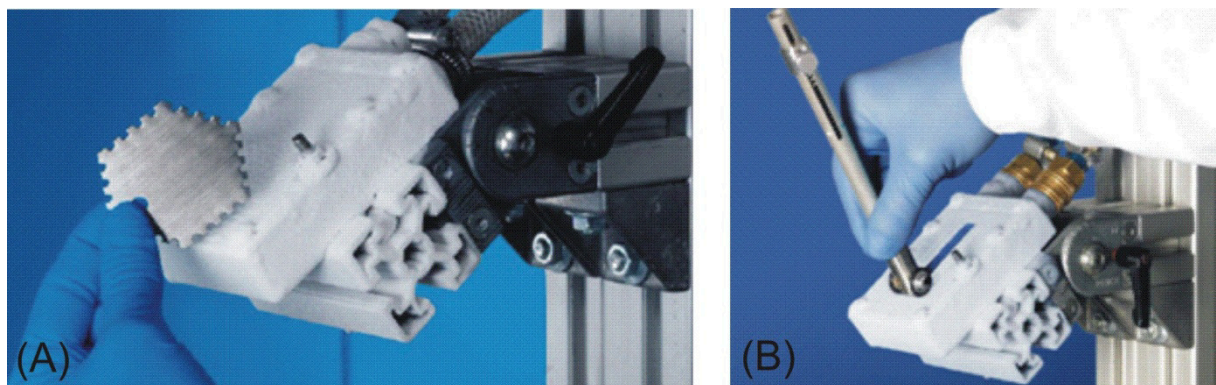


Abbildung 3-2: (A) Messung der Reifschicht mittels Messkamm. (B) Messung der Reifhaftung durch den Reif-Adhäsions-Test.

Für den Reif-Adhäsions-Test wurde ein Federkraftmessgerät genutzt, welches durch die jeweilige Bestückung mit Federn einen Druck von 3 N aufbauen kann. Dieses wurde nach der Bestimmung der Reifschichtdicke in einem Winkel von 90 ° auf die Oberfläche zur rückstandsfreien Ablösung der gebildeten Reifschicht gesetzt. Die dafür aufzuwendende Druckkraft wurde als Maß für die Reif-Adhäsion auf der Oberfläche genommen.

3.3.2.5 Präparation und Untersuchung der Proteinadsorption mittels QCM-D

In der vorliegenden Arbeit wird die QCM-D-Technik der Firma Q-Sense (Göteborg, Schweden) zur Untersuchung der Immobilisierung von gelöster Meerrettichperoxidase auf der Goldoberfläche eingesetzt.

Reinigung der Au-Quarzsensoren

Zur Reinigung wurden zunächst Au-QCM-D-Sensoren der Firma Q-Sense 10 Minuten durch eine UV/Ozon-Behandlung über die sogenannte trockene Oxidation von organischen Verunreinigungen gesäubert. Dazu wurden die Au-QCM-D-Sensoren mit der goldenen Oberseite nach oben in den UV/Ozone-ProCleanerTM von BioForce Nanosciences vorsichtig mit einer Pinzette auf eine Alufolie abgelegt. Im Anschluss wurden die Au-QCM-D-Sensoren unter Verwendung einer Quecksilberdampfampe für 10 Minuten einer starken UV-Strahlung im UV-Bereich von 180-400 nm ausgesetzt (Abbildung 3-3).

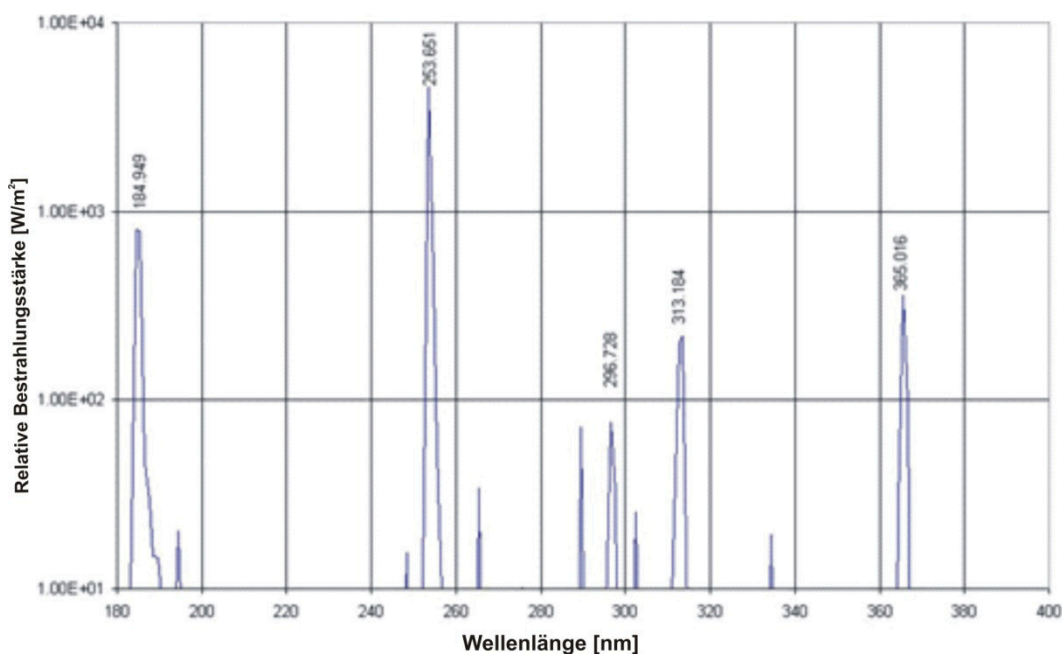


Abbildung 3-3: relative UV-Bestrahlungsstärke des verwendeten UV/Ozone-ProCleaners [167].

Die hohe Intensität der Quecksilberdampfampe erzeugt UV-Licht bei 254 nm, welches die Bindungen der organischen Moleküle auf Festkörperoberflächen spaltet. Die starke Emission des UV-Lichtes bei 254 nm wandelt Luftsauerstoff in reaktive Ozonmoleküle um, welche die vorher gespalteten organischen Moleküle angreifen und dadurch zur Erzeugung von flüchtigen organischen Molekülen beitragen [167].

Anschließend wurde eine nasschemische Oxidation durchgeführt, indem die Au-Quarzsensoren in eine, auf 75 °C erwärmte, 5:1:1 Lösung aus milli-Q-Wasser (45 %): Ammoniak (25 %):

Wasserstoffperoxid (30 %) getaucht und dort 5 Minuten belassen wurden. Nach dem Eintauchen in die Ammoniak-Wasserstoffperoxid-Lösung wurden die QCM-D-Sensoren mit bidestilliertem Wasser reichlich gewaschen und in einem Strom aus Stickstoff getrocknet. Im Anschluss wurden die QCM-D-Sensoren erneut für 10 Minuten einer UV/Ozon-Behandlung ausgesetzt. Unmittelbar nach der Reinigungsprozedur wurden die QCM-D-Sensoren nach folgendem Protokoll beschichtet.

Beschichtung der QCM-D-Sensoren mit (Mercaptopropyl)trimethoxysilan

Zum Beschichten mit (Mercaptopropyl)trimethoxysilan wurden die nach dem oben vorgestellten Reinigungsprotokoll gereinigten QCM-D-Sensoren in eine 20 mM MPTMS-Methanol-Lösung bei Raumtemperatur überführt. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 3 h wurden die Au-QCM-D-Sensoren vorsichtig mit einer gereinigten Pinzette aus der Kristallisierschale entfernt, reichlich mit Methanol gespült und in einem Strom aus Stickstoff getrocknet. Unmittelbar nach der Präparation mit MPTMS wurde eine IR-spektroskopische Analyse durchgeführt. Nach dieser erfolgte die Vernetzung der auf QCM-D-Sensoren angeordneten MPTMS-Moleküle untereinander durch die Hydrolyse und Kondensationsreaktion der MPTMS-Schicht, indem die mit MPTMS beschichteten Sensoren in eine 0,1 M HCl-Lösung für 1 h bei einer Temperatur von 80 °C überführt wurden. Danach wurden die dadurch mit HCl-Lösung behandelten Proben zuerst mit VE-Wasser gespült, anschließend mit einem Stickstoffstrom für 1 Minute getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in den evakuierten Exsikkator bei 200 mbar gebracht.

Beschichtung der QCM-D-Sensoren mit (Triethoxysilyl)undecanal

Nach dem Beschichten der QCM-D-Sensoren mit MPTMS wurde eine aldehydfunktionelle und somit aktivierte Schicht für eine spezifische Immobilisierung der Proteine erzeugt, indem der MPTMS-Film mit einem aldehydfunktionellen Organosilan (TESU) präpariert wurde. Für eine solche Präparation wurde zuerst eine 96 %-Ethanol-Lösung mit 2 % (v/v) an TESU und 1 % (v/v) Triethylamin (TEA) angesetzt. Im Anschluss wurden die mit MPTMS vorpräparierten QCM-D-Sensoren aus dem Exsikkator vorsichtig mit einer gereinigten Pinzette in eine mit TESU-Lösung gefüllte Kristallisierschale zur Inkubation überführt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumbedingungen wurden die Proben in eine gereinigte Kristallisierschale voll mit Ethanol überführt und 10 Minuten bei 100 min⁻¹ mittels Rundschüttler geschüttelt. Nach der Spülprozedur wurden die präparierten Proben einer Temperatur von 110 °C für 2 h im Ofen ausgesetzt. Schließlich wurden die aldehydfunktionalisierten QCM-D-Sensoren bis zur Immobilisierung der Proteine im Exsikkator bei 200 mbar verwahrt.

QCM-D-Messung

Nach den Präparationsschritten wurden die sehr empfindlichen QCM-D-Sensoren in die vorbereitete Durchflusskammer gelegt, diese fest verschraubt und in das Messgerät überführt.

Vor Beginn der eigentlichen Messung wurden die durch den Silanisierungsprozess beschichteten QCM-D-Sensoren getestet, ob diese Sensoren in irgendwelchen Obertönen zur Schwingung angeregt werden können. Da hier die Gefahr besteht, dass durch die Funktionalisierung der Sensor-Oberflächen die untere Kontaktfläche des Sensors in ihrer Funktion beeinträchtigt wird.

Im Anschluss wurden die Teflon-Zulaufschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm der Durchflusskammern in die Pumpe eingelegt und es wurde ein Fluss von 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingestellt. Die Proteinlösung 0,5 mg/1 mL 0,05 M Carbonatpuffer (pH = 8) wurde zunächst auf eine konstante Temperatur von 24 °C gebracht und über eine peristaltische Pumpe mit konstanter Fließgeschwindigkeit in die Sensorkammer eingeleitet, in welcher sich der beschichtete QCM-D-Sensor befand.

Vor der spezifischen Immobilisierung der Meerrettichperoxidase auf dem aldehyd-funktionalisierten QCM-D-Sensor wurde die Oberfläche des Sensors zunächst mit dem 0,05 M Carbonatpuffer (pH = 8) mit einer Fließgeschwindigkeit von 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ 20 min gespült und anschließend auf die Zuleitung der Proteinlösung mit derselben Fließgeschwindigkeit umgestellt. Der Adsorptionsprozess von Meerrettichperoxidase erfolgte über 1 Std. 40 Minuten. Nach dem Ablauf dieser Adsorptionszeit wurde die Sensor-Oberfläche mit 0,05 M Carbonatpuffer 2 h gespült, um adsorbierte Meerrettichperoxidasen von der Sensor-Oberfläche zu entfernen. Im Anschluss wurde noch das QCM-D-Experiment bezüglich der unspezifischen Immobilisierung der HRP auf der Goldoberfläche durchgeführt. Bei diesem Experiment wurde zunächst die Sensorkammer mit 0,05 M Carbonatpuffer gespült und nach 20 min wurde die Proteinlösung (0,5 mg/1 mL) in die Kammer eingeleitet. Die Adsorption erfolgte 1h 40 min lang und im Anschluss wurde die Kammer wieder mit 0,05 M Carbonatpuffer gespült.

4 Messmethoden

4.1 Dynamische Differenzkalorimetrie

DSC-Messungen wurden mit dem leistungsstarken PYRIS Diamond DSC-Messgerät von Perkin Elmer (Massachusetts, USA) durchgeführt. Alle Messungen wurden unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

4.2 Schwingungsspektroskopie an Proteinen in Lösung

Die Messungen der Sekundärstrukturanalyse der Proteine erfolgten mittels eines FT-IR-Systems für Proteinanalytik (Bruker, Ettlingen). Dieses besteht aus einem Spektrometer (Tensor 27), einer Calciumfluorid-Durchflussszelle (IR-durchlässiges und nicht wasserlösliches Kristall) AquaSpec™ Flow Cell AS1100BA von Micro Biolytics (Esslingen am Neckar, Deutschland) und einem hochempfindlichen photoelektrischen Quecksilber-Cadmium-Tellurid (MCT)-Detektor mit Flüssigstickstoffkühlung. Die AquaSpec-Zelle weist folgende technische Daten auf: Apertur 5 mm, optische Weglänge $6,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$, Druckbeständigkeit 30 bar, Temperaturbeständigkeit 4-50 °C und sowie pH-Beständigkeit im Bereich von pH 3-12 (< 5 min). Die Durchflussszelle befindet sich direkt auf einer Temperierplatte, um eine genaue Thermostatisierung der Probe zu ermöglichen. Die Temperierung auf eine Temperatur von 25 °C erfolgt über einen Kryostaten (ThermoHaake DC30-K20), welcher über die Messsoftware angesteuert wird. Außerdem verfügt die Durchflussszelle über ein austauschbares Filtersystem mit einer Porengröße von 2 μm zur Entfernung ungelöster Anteile und schützt somit die Durchflussszelle vor Verstopfungen. Der Strahlengang innerhalb des Probenraums wurde mit getrocknetem Stickstoff bei einem Druck von 0,2 bar durchgespült, um atmosphärischen Wasserdampf möglichst vollständig aus dem Strahlengang zu entfernen. Bei jeder Messung wurden 128 Scans im Wellenzahlbereich von 1000 cm^{-1} bis 3000 cm^{-1} bei einer Auflösung von 2 cm^{-1} und bei 20 kHz aufgenommen.

4.3 Röntgen-Photoelektronenspektroskopie

Für die XPS-Analysen kam ein Kratos-Ultra-System mit folgenden Messparameter zum Einsatz: Basisdruck 4×10^{-10} mbar; die Neutralisation der Probe erfolgte mit niederenergetischen Elektronen (bis zu 5 eV); Hybridmode (elektrostatische und magnetische Linen wurden verwendet); Abnahmewinkel der Photoelektronen 0°; 20 eV Passenergie in energetisch hochaufgelösten Spektren sowie 160 eV in den Übersichtsspektren. Anregung von Photoelektronen durch monochromatisierte $\text{Al}_{K\alpha}$ -Anregung ($h\nu = 1486,6 \text{ eV}$), welche bei 300 W (15 kV x

20 mA) verwendet wurde. Das zu analysierende Gebiet wurde elliptisch mit Hauptachsen von $300 \times 700 \mu\text{m}$ geformt.

4.4 Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie

Die ToF-SIMS-Analysen wurden mit einem ToF-SIMS IV-Gerät (Fa. ION TOF, Münster) durchgeführt. Parameter: Anregung mit einer 25 keV Bi-Flüssigmetallionenquelle, *bunched mode*, Analysefläche $500 \times 500 \mu\text{m}^2$. Die Massenspektren der Sekundärionen wurden im statischen Modus mit einer Erfassungszeit von 200 s in positiver und negativer Ionenpolarität im Massenbereich von 0 - 800 m/z aufgenommen.

4.5 Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der Oberflächenenergie

In dieser Arbeit erfolgten die Messung des Fortschreitwinkels aufgrund der vorhandenen Inhomogenität an Polymer-Oberflächen und die Bestimmung der freien Oberflächenenergie (OFE) nach Owens, Wendt, Rabel und Kaelble (OWRK)-Methode [168] unter Nutzung des Kontaktwinkelmessgerätes KRUESS G2/G40 (Krüss GmbH, Hamburg). Als Testflüssigkeiten wurden Wasser, Diiodmethan und Ethylenglykol verwendet, deren Oberflächenspannungen in der Tabelle 9 dargestellt sind. Diese Oberflächenspannungen wurden durch den Tensiometer (Modell DCAT 11) der Fa. Dataphysics (Filderstadt, Deutschland) überprüft. Zur Messung des dynamischen Fortschreitwinkels wurde ein Tropfenvolumen von $6 \mu\text{L}$ mit der Dosiergeschwindigkeit von $11,76 \mu\text{L}/\text{min}$. kontinuierlich auf der zu untersuchenden Proben-Oberfläche abgesetzt. Die Analyse der Kontaktwinkel und der freien Oberflächenenergie wurde automatisch von der Krüss-Software durchgeführt.

Tabelle 9: Oberflächenspannung der Testflüssigkeiten mit jeweiligen dispersen und polaren Anteil bei 20°C .

Testflüssigkeit	Oberflächenspannung in [mN/m]	Disperser Anteil in [mN/m]	Polarer Anteil in [mN/m]
doppelt dest. Wasser	72,8	21,8	51,0
Diiodmethan	50,8	50,0	0,0
Ethylenglykol	47,7	30,9	16,0

4.6 Mithras LB-940 zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Um die Aktivität der immobilisierten HRP zu detektieren, wurde ein Mikroplatten-Lesegerät Mithras LB 940 von Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland) eingesetzt, welches mit einer UV-Lampe (Halogenlampe 75 Watt) ausgestattet war. Bei der Absorptionsmessung wurde die Lampenenergie auf 30.000 gesetzt und die Zählzeit betrug dabei 0,10 Sekunden.

4.7 PM-IRRA-Spektroskopie

Für die Messung der PM-IRRA-Spektren wurde ein TENSOR 27 FT-IR-Spektrometer von Bruker Optics (Ettlingen, Deutschland) in Kombination mit PMA50 Polarisationsmodulations-Zubehör (PMA, engl. *Polarization Modulation Accessory*) verwendet. Das PMA50 ist mit einem Lock-in-Verstärker SR830-Modell von Stanford Research Systems (California, USA) und einem photoelastischen Modulator-Controller PEM-90 von Bruker Optics (Ettlingen, Deutschland) ausgestattet, welcher aus einem optischen Modulatorkristall Zinkselenid, ZnSe, Modell II/Zn50 von HINDS (Hillsboro, USA) besteht und das Infrarotlicht bei einer Frequenz von 50 kHz mit einer Retardierung von $\lambda/2$ zwischen s und p-Polarisation moduliert. Der Modulator-Controller (PEM-90) wurde eingestellt um die maximale Effizienz bei 1500 cm^{-1} zu erreichen. Bei den PM-IRRAS-Messungen wurden die Proben-Oberflächen unter streifendem Einfallswinkel von $83,5^\circ$ untersucht. Weitere Einstellungsparameter des Modulators und des Lock-in-Verstärkers sowie der OPUS-Parameter sind in der Tabelle 10 wiedergegeben und wurden während jeder Messung konstant gehalten.

Tabelle 10: Einstellungen am photoelastischen Modulator, Lock-in-Verstärker (SR830) und Darstellung der OPUS-Parameter [169].

PEM-Einstellungen	
Connect 2f-output (back) with LIA reference input	
Retardation	$\lambda/2$
Wavenumber	1600 cm^{-1}
System status	LOC
Lock-in Verstärker-Einstellungen	
Time Constant	30 μ s, 24 dB
Sensitivity	20 mV
Filters	both off (line and 2x line)
Offset:	(vor jeder Messung neu)
OPUS-Parameter	
Resolution	4 cm^{-1}
Scanner Velocity	10 kHz
High Pass Filter:	Open
Low Pass Filter:	10 kHz

Zur Detektion von IR-Daten wurde ein Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor der Fa. In-fraRed Associates genutzt. Um in diesem Detektorelement das thermische Rauschen mög-

lichst gering zu halten, wurde der Detektor vor jeder Messung mit flüssigem Stickstoff 20 Minuten lang vorgekühlt (Betriebstemperatur 77 K). Alle Spektrenauswertungen wurden unter Verwendung der Bruker-Standard-Software OPUS 6.5 von Bruker Optics (Ettlingen, Deutschland) durchgeführt.

Vor jeder Messung wurden einige manuelle Einstellungen vorgenommen. Eine davon ist die Einbringung der zu untersuchenden Proben mit der reflektierenden Seite nach vorne in die Einbuchtung des IRRAS-Halters. Anschließend wurden nach der 20 minütigen Abkühlphase des MCT-Detektors einige Einstellungen in den Optikparametern vorgenommen. Dazu wurde die Opus 6.5 gestartet und in der Funktion *erweiterte Messung* unter Optikparameter-Detektor „LN-MCT Narrow“ ausgewählt. Nach dieser Auswahl wurde der ADC-Wert dieses Signals (ADC, engl. *Analog-to-Digital Converter*) überprüft, indem das Amplituden-Maximum durch die Drehung und Feinjustierung der IRRAS-Halterung eingestellt wird. Nachfolgend wird unter Optikparameter-Detektor „LN-MCT Narrow demodulated“ ausgewählt. In dieser Einstellung wurde ein demoduliertes Differenzsignal selektiert. Im Anschluss wurde der *auto phase-Knopf* auf dem einkanaligen Lock-In Verstärker (LIA, engl. *Lock-in amplifier*) betätigt. Während der Betätigung des *auto phase-Knopfes* auf dem LIA wurde auf den angenehmen Ton vom Lock-in Verstärker geachtet. Dadurch wurde die Demodulationsphase des LIA automatisch eingestellt. Im Anschluss wurde die Lock-in Sensitivität im Falle des Au/SiO₂-Wafers auf ca. 50 μV eingestellt und auf *auto offset-Knopf* des einkanaligen Lock-In Verstärkers gedrückt. Zum Schluss wurde in der Karteikarte „Optikparameter“ des Dialogfensters Messung unter Detektor „LN-MCT Narrow+demodulated“ ausgewählt. Dadurch wurde die zweikanalige Erfassung der Signale des Lock-In Verstärkers aktiviert. Nach dieser Aktivierung konnte die Messung schließlich gestartet werden.

4.8 ATR-IR-Spektroskopie

Die Messung der ATR-IR-Spektren (ATR, engl. *Attenuated Total Reflection*) erfolgten an einem Equinox 55 FT-IR-Spektrometer (Bruker Optics, Karlsruhe) im Wellenzahlbereich von 4000 – 650 cm^{-1} , welcher mit einem KBr-Strahlteiler und einem deuteriertem Triglycinsulfat-Detektor (DTGS) ausgestattet war. Hierzu wurde eine Golden GateTM ATR-Einheit A531G (Specac) mit Diamantkristall (zwei ZnSe-Fokussierungslinsen) für einzelne interne Reflexion mit einem festeingestellten Einfallswinkel von 45 ° verwendet. Weitere Einstellungen sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Auflistung der OPUS-Parameter.

Auflösung:	4 cm ⁻¹
Messzeit Probe	32 Scans
Messzeit Hintergrund (Leere Messzelle)	32 Scans
Spiegelgeschw.	100 kHz
Tiefpassfilter:	16 kHz

Die ATR-IR-Messungen wurden in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von 21 ± 2 °C durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren, Datenspeicherung und Datenverarbeitung wurden mit der Bruker-Software OPUS 5.5 durchgeführt.

4.9 Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsmessung

Die Untersuchungen der Proteinadsorptionen wurden in dieser Arbeit an einem Quarzkristall-Mikrowaagen-Gerät Q-SenseE4 der Firma Q-Sense (Göteborg, Schweden) durchgeführt. Das Q-SenseE4-System besteht aus folgenden Komponenten: Durchflussmodul QFM 401 (aus Titan und Fluorelastomer), Messplattform QCP 401, Elektronikeinheit QE 401 (Messwertaufnahme bis zu 100 Hz), Software QSoft zur Messaufnahme in Echtzeit der Resonanzfrequenz und der Dissipation. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Quarzsensoren handelte es sich um 10 MHz, AT-geschnittene Schwingkristalle mit zwei Goldelektroden. Die Schichtdicke an Goldelektrode-Oberseite betrug etwa 100 nm. Zur Haftungsverbesserung befand sich eine Chrom-Schicht von 5 nm zwischen Gold und dem SiO₂-Sensorplättchen (Gesamtdicke 300 µm). Der Quarzkristall hatte einen Durchmesser von 14 mm, die obere Elektrode einen Durchmesser von 12 mm und die untere von 6 mm. Zur elektrischen Kontaktierung wurde der Sensor mit einer auf der Unterseite aufgedampften Goldfläche über eine Silber-Leitpaste verbunden.

4.10 Reifkammer für Reifformationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Wirkung der Anti-Frost-Protein-funktionalisierten Oberflächen wurde eine am IFAM entwickelte Vereisungskammer eingesetzt. In dieser Vereisungskammer können Wetterbedingungen von Eisregen und Reif simuliert werden. Diese Wetterbedingungen ermöglichen somit, die vereisungsmindernden Eigenschaften der Oberflächen zu überprüfen. Hierzu wurden diverse Tests entwickelt: Reif-Adhäsions-Test, welcher das Reifscenario durch die Resublimation von Wasserdampf zu festem Eis auf der Oberfläche simuliert, und Eisregen-Test, welcher das Eisregenszenario durch Klareisbildung simuliert. In dieser Arbeit erfolgte die Überprüfung der Wirkung der Anti-Frost-Proteine an der Oberfläche durch die

Durchführung des Reiftest und des Reif-Adhäsions-Test. Die Abbildung 4-1: Vereisungskammer und gibt den inneren Versuchsaufbau der Vereisungskammer wieder.

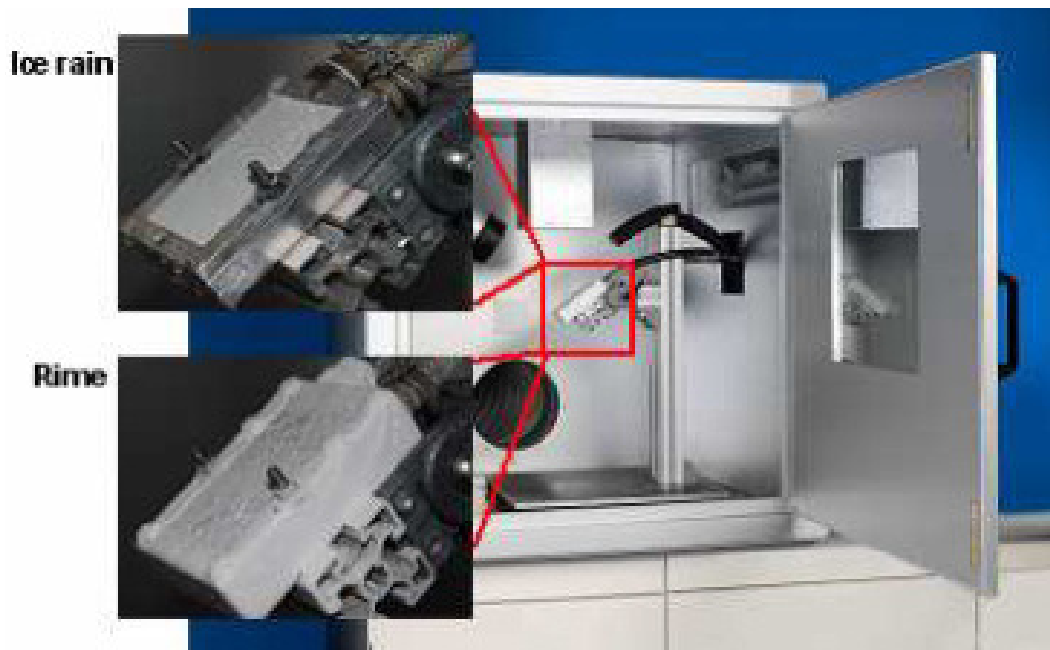


Abbildung 4-1: Vereisungskammer.

In der 1,10 x 1,10 x 1,10 m großen Vereisungskammer kann die zu untersuchende Probe durch ein Außenfenster und online durch eine eingebaute Kamera beobachtet werden. In der Mitte der Vereisungskammer befindet sich der Probenhalter mit einer Dimension von 49 x 79 mm², welcher die zu untersuchenden Proben im Winkel von 45 ° zum Luftstrom hält.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Untersuchung der Funktionswirkung des AFP Typ III

Um auf die erste Fragestellung, über das Verständnis der Zusammenhänge der Aktivität des immobilisierten und des gelösten Anti-Frost-Protein Typ III, eine möglichst differenzierte Antwort zu erlangen, werden nachfolgend Messergebnisse der Funktionswirkung des AFP Typ III sowie ausgewählte Denaturierungseffekte in Lösung diskutiert.

5.1.1 Kalibrierung der Sonokristallisation-Messvorrichtung [154]

Für eine Überprüfung der Zuverlässigkeit der Sonokristallisation-Messvorrichtung erfolgt zuerst die Kalibrierung des Gerätes unter Verwendung des Osmolality Linearity Sets. Das Osmolality Linearity Set ermöglicht eine Bestimmung der Standardabweichung über die Soll-Gefrierpunktserniedrigung, welche mit steigender osmotischer Konzentration von 100 mOsm/kg, 500 mOsm/kg, 900 mOsm/kg, 1500 mOsm/kg und 2000 mOsm/kg im Vergleich zu Wasser und auch untereinander zunimmt (Tabelle 12). Sowohl mit MilliQ-Wasser als auch mit jeder weiteren Kalibrierlösung wurden mehrere Messungen ($N \geq 3$) durchgeführt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Kalibrierung mit dem Osmolalität Linearität Set zur Verifikation der Gefrierpunktserniedrigungen im Vergleich zu Sollwerten [154].

Konzentration der Kalibrierlösung [mOsm/kg]	Gefrierpunktserniedrigung [°C]				
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	Sollwert
0 (MilliQ-Wasser)	-0,03	0,01	0,00	-0,01	0,00
100	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,19
500	-0,98	-0,99	-1,00	-0,99	-0,93
900	-1,75	-1,76	-1,75	-1,75	-1,67
1500	-2,86	-2,88	-2,85	-2,86	-2,79
2000	-3,74	-3,74	-3,76	-3,75	-3,72

Die Abbildung 5-1 zeigt die Ergebnisse der Kalibrierung. Dabei ist auffallend, dass mit zunehmender Konzentration der Kalibrierlösung bis zu 900 mOsm/kg eine steigende Temperaturdifferenz zwischen den Ist- und den erwarteten Sollwerten zu detektieren ist. Die Temperaturdifferenz erreicht mit ermittelten -0,081 °C, bei einer Konzentration der Kalibrierlösung von 900 mOsm/kg ihr Maximum. Diese Temperaturdifferenz nimmt bei noch höheren Kon-

zentrationen der Kalibrierlösung wieder ab und liegt bei einer Konzentration von 2000 mOsm/kg noch bei ermittelten $-0,03\text{ }^{\circ}\text{C}$.

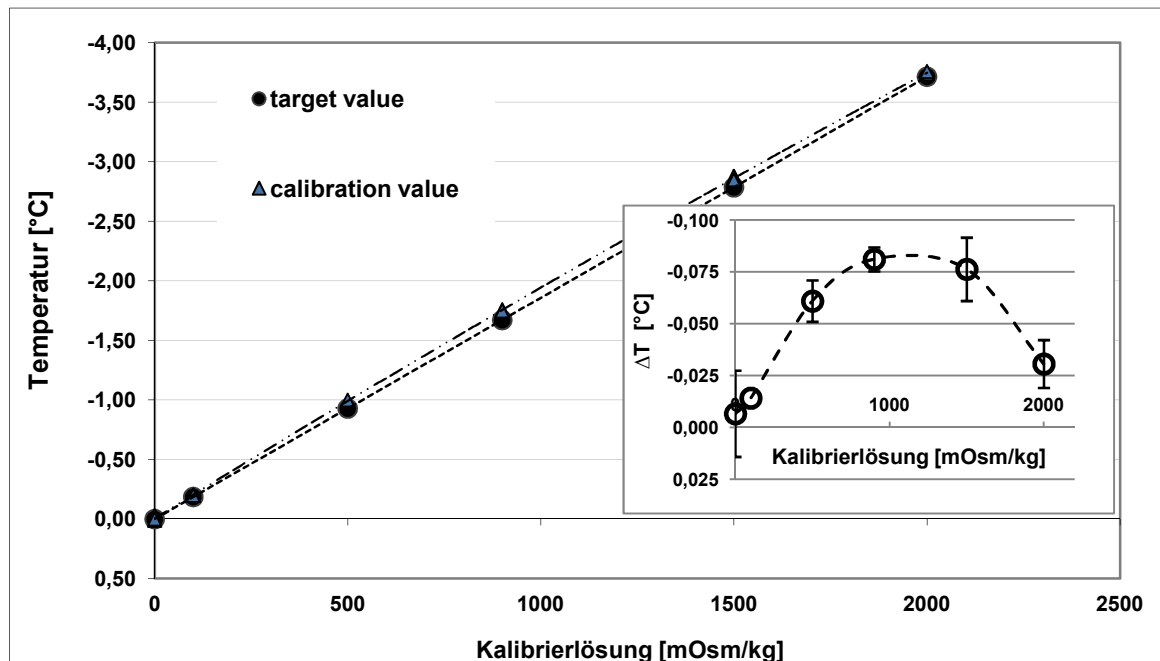


Abbildung 5-1: Ergebnisse der Kalibriermessungen (graue Dreiecke). Die schwarzen Kreise kennzeichnen die erwarteten Sollwerte. Im Innenbild sind die Differenzen zwischen den Messungen der Kalibrierlösung und den Sollwerten incl. der Standardabweichung der Messungen dargestellt [154].

5.1.2 Bestimmung der thermischen Hysterese [154]

Die Abbildung 5-2 zeigt den Verlauf einer kompletten AFP Typ III Messung mit den entsprechenden Abkühlungs-, Gefrier-, Erwärmungs- und Schmelzprozessen. Die Temperatur der Probelösung folgt der vorgegebenen Heiz- und Abkühlungstemperatur der Heizeinheit. Nach dem Abkühlungsprozess (a) und einer Unterkühlung der Probe bis zu einer Temperatur von $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird anschließend durch einen Ultraschallimpuls die Sonokristallisation (b) in der AFP Typ III-Lösung ausgelöst. Die beginnende Kristallisation (c) sorgt für einen Temperaturanstieg bis zum Erreichen des Gefrierpunktes der Probelösung. Das einsetzende thermische Gleichgewicht sorgt für die Ausbildung eines Temperaturplateaus bei der erreichten Gefrierpunktstemperatur (d). Durch den einsetzenden Temperaturanstieg der Heizeinheit wird nach dem Kreuzungspunkt zwischen der Temperatur der Heizeinheit und der Temperatur der AFP Typ III-Lösung der Übergang zur Schmelztemperatur der AFP Typ III-Lösung initiiert. Dieser Übergang ist durch die thermische Hysterese (e) gekennzeichnet. Ist die Schmelztemperatur (f) der AFP Typ III-Lösung erreicht, bildet sich wieder ein Temperaturplateau durch das thermische Gleichgewicht aus. Ist das thermische Gleichgewicht nicht mehr haltbar, folgt die Temperatur (g) der AFP Typ III-Lösung wieder der Temperatur der Heizeinheit.

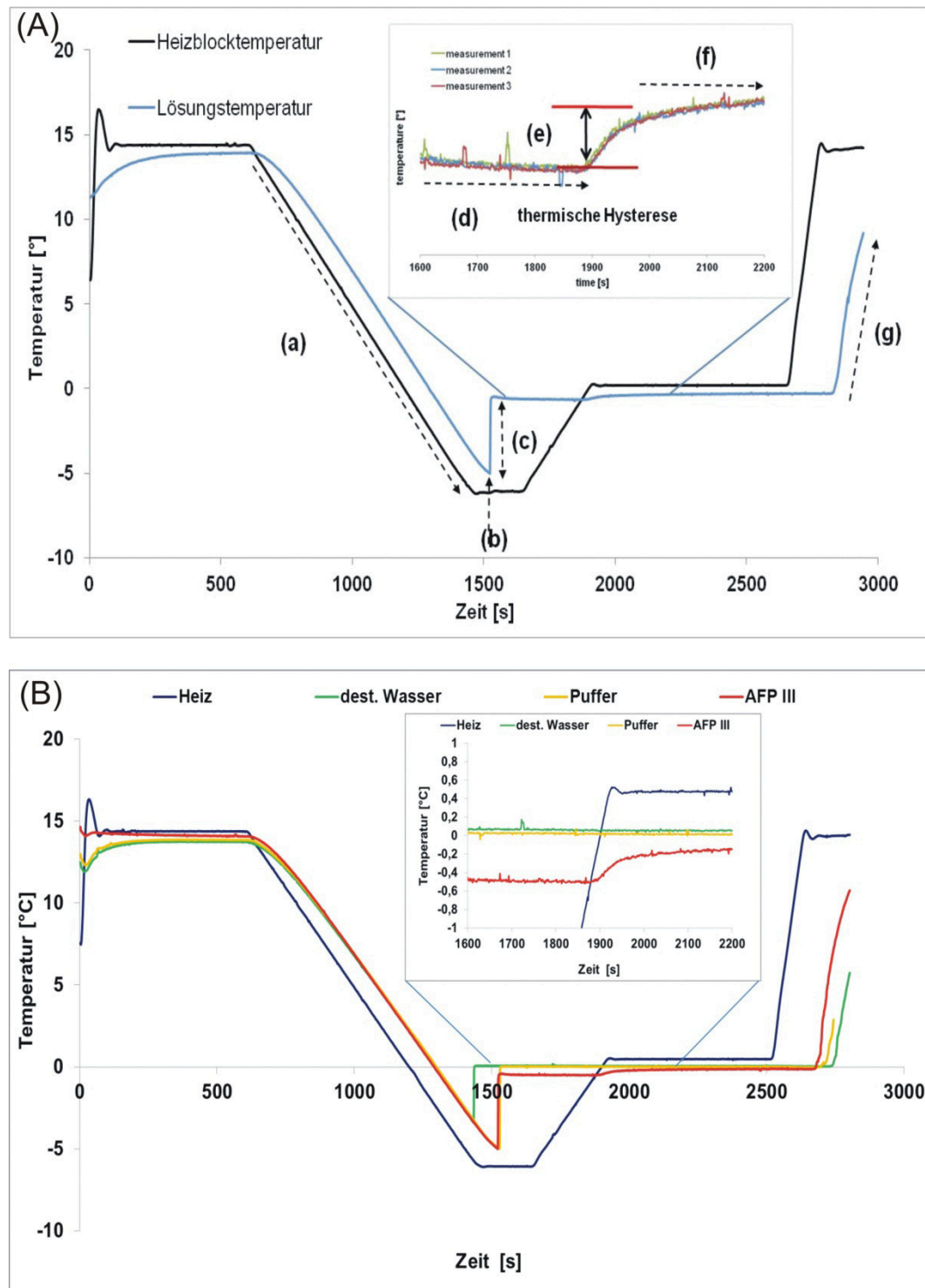


Abbildung 5-2: (A) Darstellung des Messungsverlaufs für AFP Typ III mit Vergrößerung des Auswertungsbereiches: (a) Abkühlungsprozess, (b) Auslösung der Sonokristallisation, (c) freiwerdende Kristallisationswärme, (d) „Plateau“ Gefrierpunkt, (e) thermische Hysterese, (f) „Plateau“ Schmelzpunkt, (g) Erwärmungsprozess. (B) Darstellung des Messungsverlaufs für MilliQ-Wasser, Phosphatpuffer, AFP Typ III gelöst in Phosphatpuffer.

Da die Messvorrichtung neben der Hysteresegefrierpunktserniedrigung auch die klassische kolligative Gefrierpunktserniedrigung der gelösten Salze in den Puffersystemen erfassen

kann, wurden mehrere Messungen mit Puffersystemen bei verschiedenen Salzkonzentrationen ohne weitere Zusätze durchgeführt. Durch dieses Screening kam man zu einem geeigneten Puffersystem, dem Phosphatpuffer mit einer Salzkonzentration von 0,201 g (1,48 mmol) KH_2PO_4 und 1,517 g (8,52 mmol) Na_2HPO_4 gelöst in MilliQ-Wasser (Qualität des Wassers 2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$). Der pH-Wert liegt bei dem frisch angesetzten Phosphatpuffer bei 7,4 und hat einen spezifischen Widerstand von 567,6 $\Omega\cdot\text{m}$ (elektrische Leitfähigkeit 0,00173 S m^{-1}). Die Abbildung 5-2 (B) stellt den Verlauf der Messung mit reinem Wasser und dem Phosphatpuffer dar. Für reines Wasser und Phosphatpuffer ohne weitere Zusätze ergab sich, erwartungsgemäß, keine kolligative Gefrierpunktserniedrigung. Gefrier- und Schmelzpunkt liegen auf dem gleichen Temperaturniveau. Es bildet sich daher ein durchgehendes Temperaturplateau aus. Ansonsten gelten für den Messungsverlauf des reinen Wassers oder des Phosphatpuffers die gleichen Gesetzmäßigkeiten wie für den Messungsverlauf der AFP Typ III-Messung.

Zur Überprüfung der Detektierbarkeit der thermischen Hysterese mittels dieser Messvorrichtung wurde die thermische Hysterese in Abhängigkeit von verschiedenen Massenkonzentrationen des AFP Typ III (3 mg/mL, 5 mg/mL und 7 mg/mL) unter Verwendung des ausgewählten Phosphatpuffers getestet.

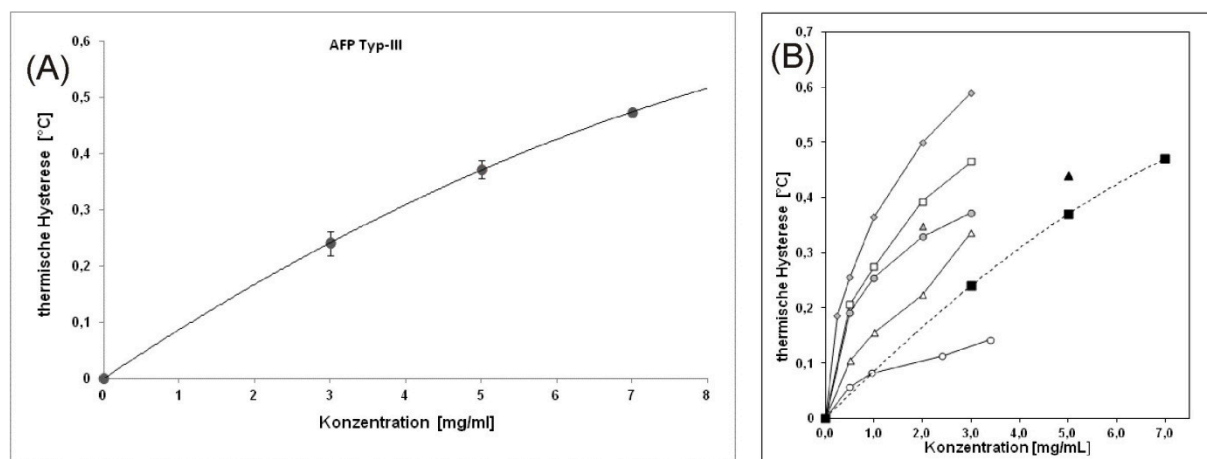


Abbildung 5-3: (A) Darstellung der thermischen Hysterese von AFP Typ III in Abhängigkeit von der Konzentration. (B) Darstellung der thermischen Hysterese verschiedener AFP Typ III-Wildformen sowie mehrerer AFP Typ III-Varianten des Ocean Pout mit einer AFP Typ III-Konzentration bis zu 3,5 mg/mL [170]. (schwarz gefülltes Dreieck: Ergebnis von Hew et al. [171] und schwarz gefüllte Quadrate: Ergebnisse eigener Messreihe).

In der Abbildung 5-3 (A) ist der Anstieg der thermischen Hysterese bei einer Zunahme der AFP Typ III Konzentration deutlich zu erkennen. Jede Messung wurde mindestens drei Mal wiederholt. Die Referenzmessung mit einer AFP Typ III-Konzentration von 0 mg/mL erfolgte mit Wasser. Für die AFP Typ III-Konzentration mit 3 mg/mL ergab sich eine mittlere thermi-

sche Hysterese von $0,240 \pm 0,021$ °C. Bei der AFP Typ III-Konzentration von 5 mg/mL stieg die mittlere thermische Hysterese bereits auf $0,370 \pm 0,016$ °C an und erreichte bei einer Konzentration von 7 mg/mL einen Wert von $0,473 \pm 0,005$ °C. In der Arbeit von Baardsnes und Davies (2002) [170] zeigte sich eine große Variationsbreite in der Ausprägung der thermischen Hysterese (Abbildung 5-3 (B)), die von der Wildform des Ocean Pout, *Macrozoarces americanus*, abhängig war. Bei einer AFP Typ III-Konzentration von 3 mg/mL lag die thermische Hysterese dadurch zwischen ungefähr 0,1 °C und 0,6 °C. Das Ergebnis dieser Untersuchung ergab für die AFP Typ III-Konzentration von 3 mg/mL eine thermische Hysterese von 0,24 °C und liegt somit in dem von Baardsnes und Davies (2002) [170] bestimmten Variationsbereich. Hew et al. (1984) [171] verwendeten für ihre Arbeit eine AFP Typ III-Konzentration des *Macrozoarces americanus* von 5 mg/mL. Die thermische Hysterese lag hier bei 0,44 °C. Die hier ermittelte thermische Hysterese für eine AFP Typ III-Konzentration von 5 mg/mL lag bei 0,37 °C. Betrachtet man die Variationsbreite der thermischen Hysterese und vergleicht sämtliche Kurvenverläufe, liegen sowohl der ermittelte Wert von Hew et al. (1984) [171] als auch die hier ermittelten Werte in einem realistischen Bereich.

Bislang steht eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung der thermischen Hysterese der Anti-Frost-Proteine in Lösung. Am häufigsten wird bei dieser Art der Analyse ein Clifton Nanoliter-Osmometer verwendet, dessen Messung auf dem Kristallwachstumsverfahren beruht. Hierzu wird eine Lösung mit einem Volumen von (~ 1 nL) bis zum Gefrieren abgekühlt und im Anschluss wieder geschmolzen, bis nur noch einzelne Eiskristalle vorliegen. Dabei wird die Temperatur, bei der ein Eiskristallwachstum stattfindet, als thermische Hysterese angenommen und zum Teil als sehr subjektive und ungenaue Methode zur Bestimmung der Anti-Frost-Schutzaktivitäten eingestuft. Nichtsdestotrotz ist das Clifton Nanoliter Osmometer bestens für lichtmikroskopische und direkte Beobachtungen der Veränderung der Eiskristallmorphologie geeignet [172].

Weiterhin wird sehr häufig eine thermoanalytische Methode, die Dynamische Differenz-Kalorimetrie, zur Bestimmung der thermischen Hysterese eingesetzt [173], [174], [175]. Jedoch wird an dieser Stelle auf eine Beschreibung der DSC zwecks eines Vergleichs der Methoden verzichtet, weil im nachfolgenden Unterkapitel darauf detailliert eingegangen wird.

Zur Bestimmung der thermischen Hysterese der Anti-Frost-Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit die am IFAM neue entwickelte Messvorrichtung Sonokristallisation eingesetzt. Dabei stellt die Sonokristallisation eine Alternative zu herkömmlichen Methoden der Kristallisation dar, und zwar durch die Einführung von Impfkristallen in eine unterkühlte Lösung. Das Hinzufügen von Impfkristallen kann erstens zu Verunreinigungen der zu untersuchenden Protein-

Lösung führen [176] und zweitens die Bestimmung der nicht-kolligativen Gefrierpunktserniedrigung verfälschen. Maßgeblich für die Kristallisation durch Ultraschall sind die Parameter Ultraschallfrequenz, Leistung und Beschallungsdauer [176]. Allerdings sind die physikalischen Prozesse, welche die Bildung der Kristallisationskeime auslösen, bis heute nicht eindeutig aufgeklärt [176], [177]. Inzwischen weiß man durch die Arbeit von Nalajala et al. [178], dass offenbar die akustische Kavitation mit der Bildung der Kristallisationskeime in einem direkten Zusammenhang steht.

Bei der Sonokristallisation findet eine Einleitung der Schallwellen direkt in die unterkühlte Flüssigkeit statt [177]. Verfügt das Schallfeld des Ultraschallimpulses über eine ausreichende Amplitude, so entsteht ein Unterdruck, dessen Stärke ausreichend ist, um die Expansion mikroskopisch kleiner, vermutlich in der Lösung vorhandener Gasblasen auszulösen. Durch ihr Wachstum erreichen diese Kavitationsblasen makroskopische Größe, bevor sie durch den umgebenden Außendruck implodieren [179]. Bei der Implosion solcher Gasblasen fungieren verbleibende restliche Kavitationsblasen vermutlich als Kristallisationskeime und dienen damit als Träger für die entstehenden Eiskristalle [177]. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, den kompletten Abkühlungs-, Gefrier-, Erwärmungs- und Schmelzprozess in einer einzigen Messkurve elektronisch aufzunehmen und durch den Kurvenverlauf einen sehr genauen Aufschluss über die thermische Hysterese zu erhalten.

5.1.3 Untersuchung der thermischen Hysterese mittels DSC

Um die DSC-Messmethode bezüglich der Bestimmung der thermischen Hysterese zu überprüfen, wurde zunächst das Lysozym, welches keine kristallisationshemmenden Eigenschaften im Vergleich zu AFP Typ III aufweist, mit derselben Stoffmengenkonzentration wie eine AFP Typ III-Probe vermessen. Einen Ausschnitt aus dem Messverlauf der beiden Proteine gibt die Abbildung 5-4 wieder. Anhand des Verlaufs der Kristallisationskurve ist auffallend, dass der Kristallisationsvorgang bei AFP Typ III mit einer Verzögerung im Vergleich zum Lysozym einsetzt, was ein direkter Beweis für die denukleierende Wirkung des Anti-Frost-Proteins im Gegensatz zum Lysozym ist. In diesem Zusammenhang wurde ein anderes Protein, das Rinderserumalbumin (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*), ohne eine sogenannte Eisbindungsstelle, von M. Lu et al. [180] und von X. Mao et al. [181] mithilfe von DSC untersucht. Bei dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass dieses Protein keinerlei Effekt auf die thermische Hysterese verursacht, trotz vorhandener Polyolkomponenten, welche über Wasserstoffbrückenbindungen die Eiskristallisation beeinflussen könnten. In diesem Kontext wurde die Beziehung zwischen den Konformationen der Polyole und ihrer Fähigkeit zu Aus-

bildung der thermischen Hysterese systematisch von N. Amornwittawatt et al. [182] und E. Baruch et al. [183] studiert.

In der Literatur werden verschiedene Hypothesen zur Funktionsweise der Anti-Frost-Proteine in wässriger Lösung diskutiert. Eine davon wurde von Kristiansen et al. [86] als kristallisationshemmende Wirkung durch den Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus formuliert. Bei diesem Mechanismus existierte eine Eisbindungsstelle in der Hydrathülle [184], basierend auf der spezifischen Konstitution der Aminosäuren und der Mikrokonformation mit der Berücksichtigung des thermodynamischen Gleichgewichts, ausgebildet. So eine Stelle in der Hydrathülle ist aufgrund ihrer Wasserstoffbrückeninteraktionen möglicherweise für die kristallisationshemmende Wirkung verantwortlich und wird durch folgende exponierte Aminosäurenreste des AFP Typ III gebildet: Gln-9, Leu-10, Pro-12, Thr-18, Leu-19, und Val-20 [185]. In diesem Zusammenhang wurde in der Studie von Z. Jia et al. [186] die Auswirkung einer Mutation der eisbindenden Aminosäurenreste des AFP Typ III auf die Frostschutzaktivität untersucht. So berichten sie über einen Verlust der Frostschutzaktivität um 70-80 % durch eine Substitution der Seitenketten Thr-15 gegen Ala sowie Thr-18 gegen Ala. Dieses Ergebnis deutet auf die essenzielle Rolle der einzelnen wasserstoffbrückenbindenden Gruppen der eisbindenden Aminosäurereste bei der Wirkungsweise des Proteins.

Eine andere Hypothese wurde von Meister et al. [187] durch die Analyse mittels Terahertz-Spektroskopie widerlegt. Der Effekt der Anti-Frost-Proteine soll demzufolge nicht nur auf den direkten Kontakt mit Eis und somit auf den direkten Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus zurückzuführen sein, sondern die Wirkung kann aufgrund des außergewöhnlichen Hydrathüllen-Aufbaus des Proteins über eine größere Distanz erfolgen.

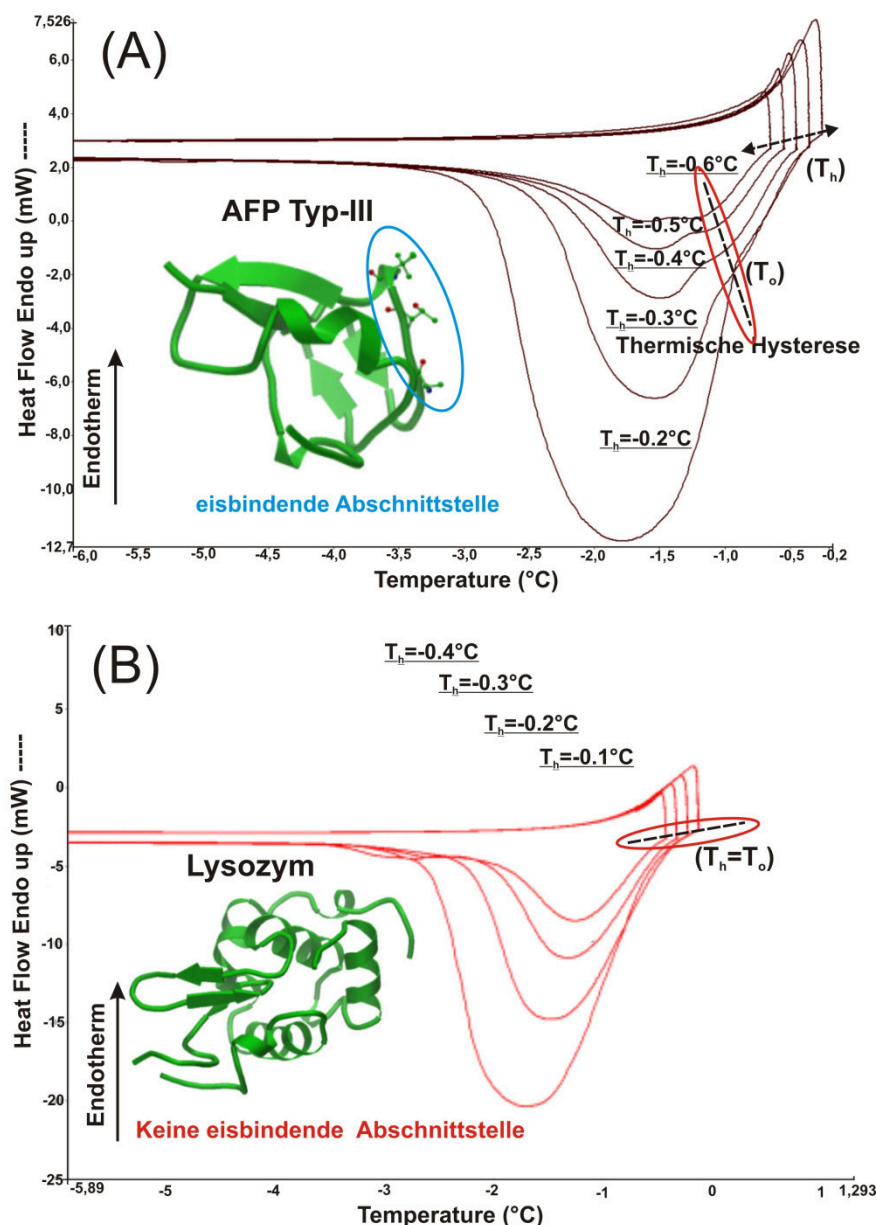


Abbildung 5-4: (A) Darstellung des DSC-Thermogramms mit einer Heiz- und Kühlgeschwindigkeit von 3,0 °C/min der AFP Typ III-Lösung ($n_{\text{AFP-III}} = 4,28 \cdot 10^{-4}$ mol gelöst in Phosphatpuffer (1,48 mmol KH_2PO_4 und 8,52 mmol Na_2HPO_4)) bei verschiedenen Haltetemperaturen $T_h = -0,6, -0,5, -0,4, -0,3$ und $-0,2$ °C. (B) Darstellung des DSC-Thermogramms mit einer Heiz- und Kühlgeschwindigkeit von 3,00 °C/min der Lysozym-Lösung ($n_{\text{Lysozym}} = 4,28 \cdot 10^{-4}$ mol gelöst in Phosphatpuffer (1,48 mmol KH_2PO_4 und 8,52 mmol Na_2HPO_4)) bei verschiedenen Haltetemperaturen $T_h = -0,4, -0,3, -0,2$, und $-0,1$ °C.

Zur Bestimmung der thermischen Hysteresis des AFP Typ III und des Lysozyms werden verschiedene Haltetemperaturen (T_h , engl. hold temperature) nach Aufschmelzen eines bestimmten Anteils im Zweiphasensystem (fest/flüssig) eingestellt. Anschließend werden die Onset-Temperaturen (T_o) nach dem Einsetzen des Gefriervorganges bei den jeweiligen Haltetemperaturen in den Thermogrammen ermittelt, um den Einfluss der Proteine auf das Kris-

tallisationsverhalten von aufgeschmolzenem Wasser zu analysieren. Im Allgemeinen spiegelt sich der Einfluss der zu untersuchenden Proteine auf das Kristallisationsverhalten von Wasser durch die Form des Kristallisationspeaks bei verschiedenen Eis-Fractionen während des Gefriervorganges wider (Abbildung 5-4). Für die Bestimmung der verschiedenen Eis-Fractionen im geschlossenen System sind die endotherme Schmelzenthalpie ΔH_m und die exotherme Kristallisationsenthalpie ΔH_r erforderlich, die mithilfe der Dynamischen Leistungs-Differenzkalorimetrie (DLDK) aufgenommen werden. Die Berechnung des prozentualen Gehalts an gefrierbarem Wasser der Protein-Lösung erfolgt damit wie folgt:

$$\Delta_{ice-nuclei} = [1 - (-\Delta H_r) / \Delta H_m] \cdot 100\% \quad (5-1) [180]$$

ΔH_r und ΔH_m sind Kristallisationsenthalpie und Schmelzenthalpie. Die thermische Hysterese wird bei DSC als die Differenz zwischen T_h (Haltetemperatur) und T_o (Onset-Temperatur) definiert und führt zur quantitativen Beurteilung der Aktivität der Anti-Frost-Proteine bei verschiedenen Eis-Fractionen [180]. In den Tabellen 13 und 14 sind die nach der Gleichung 5-1 berechneten Eisfraktionen und die dazugehörigen Enthalpien zusammengefasst.

Tabelle 13: Bestimmung der thermischen Hysterese des Lysozyms ($n = 4,28 \cdot 10^{-4}$ mol) in Phosphatpuffer (1,48 mmol KH_2PO_4 und 8,52 mmol Na_2HPO_4).

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
T_h [°C]	-0,40	-0,30	-0,20	-0,10
T_o [°C]	-0,50	-0,40	-0,30	-0,24
H_r [J/g]	-47,47	-71,96	-130,37	-229,57
Eisgehalt [%]	83,48	74,95	54,63	20,11
THA [°C]	0,10	0,10	0,10	0,14
$H_{m, \text{Lysozym}} = 287,37 \text{ J/g}$, $H_{m, H_2O} = 379,5 \text{ J/g}$ [15] und $THA = T_h - T_o$				

Als Erstes ist in der Tabelle 13 auffällig, dass die Schmelzenthalpien der Proteinlösungen im Vergleich zum reinen Wasser kleiner ausfallen. Beispielsweise beträgt die Schmelzenthalpie im Falle von Lysozym/Wasser 287,37 J/g ($n_{\text{Lysozym}} = 4,28 \cdot 10^{-4}$ mol), was einer prozentualen Abweichung zum reinen Wasser mit einer Schmelzenthalpie von 379,5 J/g von 32 % entspricht. Dies ist ein Indiz dafür, dass fast 32 % des vorliegenden Wassers im Zweikomponentensystem Lysozym/Wasser in einem nicht kristallisierten Zustand vorliegt. Wird ein Anteil von nicht kristallisiertem Wasser von 32 % zu den 0,6 Gew.-% Lysozym hinzuaddiert, ist davon auszugehen, dass die hydratisierte Phase im Falle des Enzyms bei 32,7 % liegt. Dadurch wird die Peaktemperatur der Kristallisation im Vergleich zu Wasser mit -13,8 °C zu einem niedrigen Wert von -20,5 °C verschoben [15].

Tabelle 14: Bestimmung der thermischen Hysterese des AFP Typ III ($n = 4,28 \cdot 10^{-4}$ mol) in Phosphatpuffer (1,48 mmol KH_2PO_4 und 8,52 mmol Na_2HPO_4).

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
T_h [°C]	-1,00	-0,90	-0,80	-0,70
T_o [°C]	-1,11	-1,52	-1,42	-1,43
H_r [J/g]	-57,54	-73,60	-151,46	-291,80
Eisgehalt [%]	82,57	77,71	54,13	11,63
THA [°C]	0,11	0,62	0,62	0,73
$H_{m, \text{AFP-III}} = 330,74 \text{ J/g}$, $H_{m, \text{H}_2\text{O}} = 379,5 \text{ J/g}$, $\text{THA} = T_h - T_o$				

Im Falle der AFP Typ III-Lösung ist besonders auffallend, dass die Schmelzenthalpie mit 330,74 J/g im Vergleich zu der des Lysozym höher liegt. Die prozentuale Differenz zu reinem Wasser mit einer Schmelzenthalpie von 379,5 J/g entspricht 14,7 %. Dies bedeutet, dass der nicht kristallisierte Anteil im AFP Typ III/Wasser-Gemisch fast 14,7 % beträgt. Wird wieder ein Anteil von nicht kristallisiertem Wasser von 14,7 % zu 0,1 Gew.-% ($n_{\text{AFP Typ III}} = 4,28 \cdot 10^{-4}$ mol) addiert, kann man fast von einer zu 14,8 % hydratisierten Phase ausgehen [15].

Dadurch wird die Peaktemperatur der Kristallisation der AFP Typ III-Lösung im Vergleich zu Wasser mit -13,8 °C zu einem niedrigeren Wert von -16,1 °C verschoben. Genau ein solches Kristallisationsverhalten wurde bei bioinspirierten Antifreezepolymer-Additiven durch wissenschaftliche Publikationen von Y. Mastai et al. [188], E. Baruch et al. [189] sowie von M. Antonietti et al. dokumentiert [190].

Weiterhin ist auffallend, dass die thermische Hysterese sehr stark in Korrelation zum Eisgehalt des Zweikomponentensystems (Wasser/Eis) steht und insbesondere bei sehr niedriger Konzentration an AFP Typ III gut sichtbar ist (Tabelle 15). Dieser Befund wurde bereits in Verbindung mit anderen Anti-Frost-Proteinen dokumentiert [181], [191].

Tabelle 15: Bestimmung der thermischen Hysterese von AFP Typ III (0,5 mg/mL) in Phosphatpuffer (1,48 mmol KH_2PO_4 und 8,52 mmol Na_2HPO_4).

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
T_h [°C]	-0,30	-0,20	-0,10	0,00	0,10
T_o [°C]	-0,40	-0,35	-0,47	-0,51	-0,70
H_r [J/g]	-48,27	-62,26	-115,52	-208,52	-282,03
Eisgehalt [%]	84,30	79,71	62,33	32,02	8,05
THA [°C]	0,13	0,15	0,37	0,51	0,60
$\Delta H_m = 306,74 \text{ J/g}$					

In der Tabelle 16 wurde die mithilfe der DSC-Methode ermittelte thermische Hysterese bei verschiedenen Massenkonzentrationen im Vergleich zur thermischen Hysterese, die mittels Sonokristallisation ermittelt wurde, dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die mittels DSC ermittelten Werte der thermischen Hysterese höher ausfallen als die mithilfe der Sonokristallisation ermittelten. Diese Differenzen in der thermischen Hysterese zwischen den Messwerten, sind eindeutig auf die experimentellen Details zurückzuführen. Zum Beispiel kann diese Differenz durch den Unterschied in der Heiz- und Kühlgeschwindigkeit hervorgerufen worden sein. Im Falle der Sonokristallisation beträgt die Heiz- und Kühlgeschwindigkeit 1,5 °C/min, im Vergleich zu DSC mit 3,0 °C/min. Ein weiterer Unterschied ist auf den Auslöser der Kristallisation des Zweikomponentensystems Protein/Wasser mit Puffer zurückzuführen. Denn während die Auslösung der Kristallisation im Falle der Sonokristallisation durch Ultraschall erfolgt, wird im Falle der DSC-Methode die Kristallisation thermisch ausgelöst. Maßgeblich für die Kristallisation durch Ultraschall sind die Parameter Ultraschallfrequenz, Leistung und Beschallungsdauer [176].

Tabelle 16: Thermische Hysteresen des AFP Typ III aus DSC und Sonokristallisation in Konzentrationsabhängigkeit.

	Konzentration [mg/mL]				
	7	5	3	1	0,5
DSC					
THA [°C]	1,03	0,94	0,73	0,66	0,60
Sonokristallisation					
THA [°C]	0,47	0,37	0,24	-	-

Allerdings sind die physikalischen Prozesse, welche eine Bildung der Kristallisationskeime auslösen, bis heute nicht eindeutig aufgeklärt [176], [177]. Inzwischen weiß man durch die Arbeit von Nalajala et al. [178], dass offenbar die akustische Kavitation mit der Bildung der Kristallisationskeime in direktem Zusammenhang steht.

Des Weiteren ist festzustellen, dass die thermische Hysterese nicht nur von der Massenkonzentration sondern auch vom Eisgehalt in dem Zweikomponentensystem AFP Typ III/Wasser mit Puffer abhängig ist. In der Tabelle 15 ist die Abhängigkeit der Frostschutzaktivität vom Eisgehalt deutlich erkennbar. So ist bei einem Eisgehalt von 84,30 % eine thermische Hysterese von 0,13 °C zu detektieren, während bei einem Eisgehalt von 8,05 % eine thermische Hysterese von 0,60 °C detektiert wird.

5.1.4 Untersuchung des pH- und des Temperatureinflusses

5.1.4.1 Effekt der thermischen Denaturierung auf das AFP Typ III

Thermisch induzierte strukturelle Veränderungen des AFP Typ III wurden mittels IR-Spektroskopie untersucht. Die Abbildung 5-5 zeigt die Infrarot-Spektren in 10 mM Phosphatpuffer vom nativen Zustand des AFP Typ III (IR-Spektrum 5-5a) im Vergleich zu verschiedenen thermisch denaturierten Zuständen nach einer thermischen Behandlung von 30 Minuten bei 11 °C (5-5b), 30 °C (5-5 c) und schließlich bei 40 °C (5-5d). Hierzu wurden die Proteinlösungen unter den jeweiligen Temperaturen 30 Minuten behandelt und anschließend in einem Reaktionsgefäßgestell ca. 2 Stunden unter Raumbedingungen gelagert.

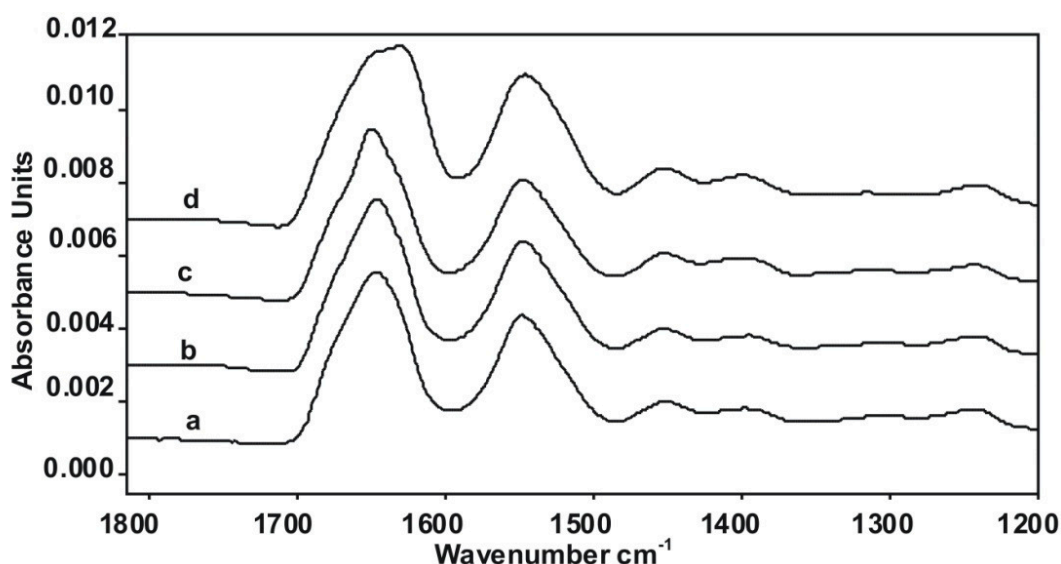


Abbildung 5-5: IR-Spektren des nativen AFP Typ III (0,4 mM) gelöst in 10 mM Phosphatpuffer (pH = 7,4) (a), und nach der thermischen Behandlung (b) bei 11 °C, (c) bei 30 °C und bei 40 °C.

Beim Vergleich der IR-Spektren von nativem und thermisch denaturierten AFP Typ III ist besonders auffallend, dass sich die Form der Amid-I-Bande bei 1650 cm⁻¹ ändert. Um die Änderungen der Amid-I- und -II-Bande festzuhalten, wurden alle Spektren durch die Nutzung der Minimum-Maximum-Methode auf eine konstante Spektralbande normiert. Der Skalierungsfaktor der Normierung basierte dabei auf dem Wellenzahlbereich von 1260 cm⁻¹ (x-Startpunkt) bis 1269 cm⁻¹ (x-Endpunkt). Der Integrationsbereich bei der Amid-I-Bande lag zwischen 1700 und 1500 cm⁻¹. Im Falle der Amid-II-Bande bei 1550 cm⁻¹ war der Integrationsbereich zwischen den Integralgrenzen 1600 und 1592 cm⁻¹ gesetzt.

In der Tabelle 17 sind die Absorptionsflächen der integralen Berechnungen des nativen AFP Typ III bei Raumtemperatur im Vergleich zu thermisch behandelten Proteinen bei 11 °C, 30 °C und bei 40 °C aufgeführt.

Tabelle 17: Darstellung der integrierten Absorptionsflächen von Amid-I- und Amid-II-Bande des AFP Typ III in Temperaturabhängigkeit.

AFP Typ III bei verschiedenen Temperaturen	Integrierte Absorptionsfläche (-) von Amide-I-Bande 1650 cm ⁻¹ (peak region 1700 - 1600 cm ⁻¹)	Integrierte Absorptionsfläche (-) von der Amide-II-Bande 1550 cm ⁻¹ (peak region 1592 - 1500 cm ⁻¹)
20,3 °C (natives Protein)	1083,7	581,5
11 °C	1038,3	540,2
30 °C	1210,7	658,2
40 °C	1384,6	760,4

Im Falle der thermischen Behandlung bei 11 °C sind fast keine Veränderungen in der Absorptionsfläche von Amid I- und Amid-II-Bande im Vergleich zum nativen Protein detektierbar. Erst bei einer thermischen Behandlung von 30 °C ist die Entfaltung des Proteins mit einer Intensitätserhöhung der Amid I- und Amid-II-Bande zu erkennen, welche sich in der steigenden integrierten Absorptionsfläche der Amid-I-Bande von 1083,7 (natives Protein bei 20,3 °C) auf 1210,7 und der Amid-II-Bande von 581,5 (natives Protein bei 20,3 °C) auf 658,2 widerspiegelt. Bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur um 10 °C von 30 °C auf 40 °C fällt eine noch stärkere Zunahme der integrierten Absorptionsflächen der Amid-I- und der Amid-II-Bande im Vergleich zum nativen Zustand des AFP Typ III von 1083,7 (bei 20,3 °C) auf 1384,6 (bei 40 °C) und von 581,5 (bei 20,3 °C) bis 760,4 (bei 40 °C) an. Ausgehend vom nativen Zustand des AFP Typ III bei Raumtemperatur als Absolutwert beträgt die prozentuale Veränderung der integrierten Absorptionsfläche der Amid-I-Bande bei 30 °C 11,7 % und bei 40 °C 27,8 % und der Amid-II-Bande bei 30 °C 13,2 % und bei 40 °C 30,7 %. Um die thermisch induzierte strukturelle Veränderung anhand der Sekundärstrukturanteile statt der Veränderungen in den integrierten Absorptionsflächen der Amid I- und II-Banden zu betrachten, wurden mithilfe der Partial-Least-Squares-Methode (PLS) anhand einer Datenbank mit insgesamt 43 verschiedenen Proteinen aus Röntgenstrukturanalyse die Sekundärstrukturanteile der thermisch vorbehandelten AFP Typ III-Proteine ermittelt. In der Abbildung 5-6 sind die Sekundärstrukturanteile in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Hier ist auffallend, dass das Entfaltungsverhalten des AFP Typ III bei der thermischen Denaturierung bei einer Temperatur von 40 °C mit einer Abnahme der α -Helix von 18,3 % (bei 20,3 °C) auf 9,3 % (bei 40 °C) und einer gleichzeitigen Zunahme des β -Faltblatts von 25,8 % (bei 20,3 °C) auf 42,1 % (bei 40 °C) detektiert wird. In Tabelle 18 sind Literaturwerte aus Experimenten für eine Zuordnung der Amid I- und Amid-II-Bande in verschiedenen Sekundärstrukturanteilen

dargestellt, die als eine Stütze bei der Interpretation der IR-Daten dienen sollen. In Tabelle 18 ist eine große Überlappung der Absorptionsbereiche der Amid-I- und Amid-II-Banden zu erkennen, die bestimmten Sekundärstrukturanteilen im Protein zugeordnet werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die prozentuale α -Helix-Abnahme während der thermischen Denaturierung nicht nur mit einer gleichzeitigen Zunahme der β -Faltblatts, sondern auch mit einer gewissen Zunahme an Random Coil-Anteil bei der Absorption von 1658 cm^{-1} und 1520 cm^{-1} erfolgt, die mithilfe der Partial-Least-Squares-Methode nicht separat abgeschätzt wurde, sondern zu dem prozentualen β -Faltblatt-Anteil hinzugerechnet wurde. Aus diesem Grund sollen die berechneten Absolutwerte der Sekundärstrukturanteile differenziert betrachtet werden. Um die genaue thermisch induzierte Veränderung in den Sekundärstrukturanteilen zu charakterisieren, müssen weitere analytische Methoden kombiniert werden.

Tabelle 18: Theoretische Zuordnung der Amid I- und Amid-II-Bande in verschiedenen Sekundärstrukturanteilen.

Sekundärstrukturanteile	Amid-I-Bande (cm^{-1})	Amid-II-Bande (cm^{-1})
α -Helix	1644 ± 2 [134]	1548 ± 2 [134]
β -Helix	1638 [192]	-
β -Faltblatt	1691 ± 1 , 1615 ± 1 [134]	1563 ± 3 , 1535 ± 2 [134]
Ungeordnete Struktur (random coil)	1650 ± 2 [134]	1553 ± 2 [134]
β -Schleife (engl. β -turn)	1661; 1667; 1673; 1677 [193]	1528; 1577 [193]
Aggregierte Proteine	1615-1620 [193]	-
Antiparalleles β -Faltblatt	1626 [194], 1630-1620 [195]	-
Paralleles β -Faltblatt	1637 [194]	-

Zum thermisch bedingten Entfaltungsverhalten mit der α -Helix-Abnahme und gleichzeitiger β -Faltblatt-Zunahme wurde bereits bei anderen Proteinen wie Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumine*, BSA) von Moriyama et al. [196] mittels elektronischer CD-Spektroskopie berichtet. Die Berechtigung des Einsatzes der IR-Spektroskopie bei der Untersuchung der thermischen Denaturierung von Biomolekülen wird durch weitere wissenschaftliche Arbeiten bestätigt, so berichten Chen et al. [197] über eine ähnliche strukturelle Reaktion des Glycinins auf thermische Denaturierung bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Eine mögliche Erklärung für die Ursache der thermischen Denaturierung ist die veränderte Solvation des AFP Typ III im gelösten Zustand. Bei tiefen Temperaturen diffundieren mehr

Wassermoleküle in das Innere des Proteins, was dazu führt, dass in dem Protein bestehende intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen z. B. in der α -Helix-Struktur bei einer Bindungsenergie von 16 - 60 kJ/mol aufgebrochen werden und neue intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen im β -Faltblatt ausgebildet werden. Durch diese Art der Verstärkung der unvorteilhaften Wechselwirkung wird der hydrophobe Effekt, welcher die Aggregation der unpolaren Aminosäureseitenketten im Inneren des Proteins stabilisiert, beeinträchtigt und führt zu einer strukturellen Neuordnung des Proteins. Die Erkenntnis, dass die thermisch induzierten Konformationsänderungen bei biologischen Systemen zum Verlust der Aktivität führen, wurde ebenfalls durch mehrere Studien bestätigt [198], [199], [200]. Demzufolge wird die Auswirkung der thermisch induzierten Konformationsänderung auf die Aktivität des AFP Typ III durch die Messung der thermischen Hysterese mittels Sonokristallisation untersucht.

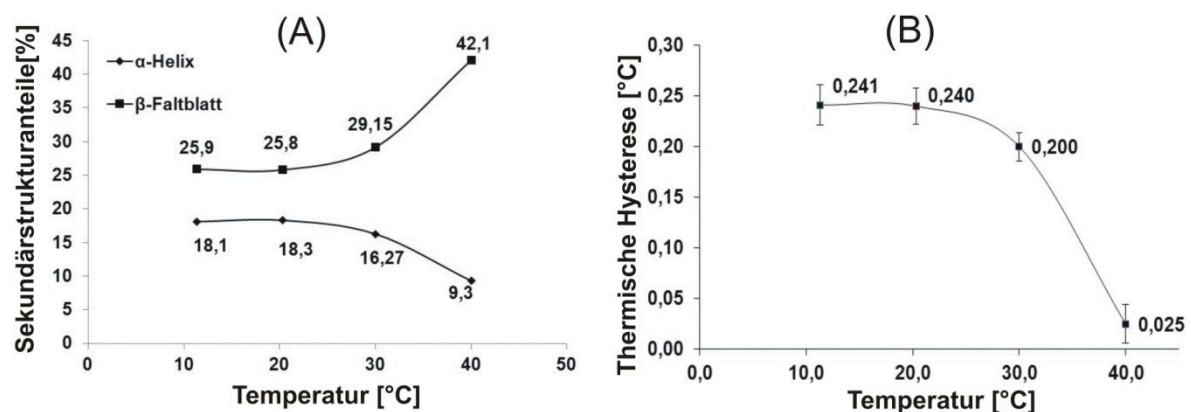


Abbildung 5-6: (A) Sekundärstrukturveränderung in Abhängigkeit von der Temperatur. (B) Änderung der thermischen Hysterese in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die Abbildung 5-6 (B) zeigt die thermische Hysterese-Änderung des AFP Typ III in Abhängigkeit von Temperatur. Es fällt auf, dass der komplette Verlust der thermischen Hysterese bei der thermischen Behandlung bei 40 °C mit einer Abnahme der α -Helix von 18,3 % (bei 20,3 °C) auf 9,3 % (bei 40 °C) und gleichzeitiger Zunahme des β -Faltblatts von 25,8 % (bei 20,3 °C) auf 42,1 % (bei 40 °C) erfolgt. Bei einer thermischen Behandlung bei 30 °C ist ein Aktivitätsverlust um 13 % mit der thermischen Hysterese von $0,20 \pm 0,014$ °C im Vergleich zum nativen AFP Typ III mit der thermischen Hysterese von $0,23 \pm 0,018$ °C zu erkennen. Zu thermischen Denaturierungsstudien des AFP Typ III (*Macrozoarces americanus*) existieren bereits zwei Arbeiten. Eine davon wurde von Ananthanarayanan et al. [201] mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 0 - 60 °C durchgeführt. Es sei zu dieser Studie angemerkt, dass in dieser nur die thermische Auswirkung auf die Konformation des AFP Typ III mithilfe der CD-Spektroskopie diskutiert wurde, wobei auf die Auswirkungen dieser strukturellen Veränderung auf die Aktivität analytisch nicht eingegangen wurde. Eine weitere Studie

von Garcia-Arribas [202] berichtet mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie bei 304 nm, dem Tyrosin-Absorptionsmaximum, über die thermische Degradierung des AFP Typ III. Allgemein scheint die thermische Denaturierung von verschiedenen Anti-Frost-Proteinen hoch zu sein [202].

5.1.4.2 Effekt des pH auf das AFP Typ III

Linderström-Lang (1924) war der erste Biochemiker, der einen plausiblen Grund für die Destabilisierung der Proteine bei extremen pH-Werten genannt sowie seine Hypothese durch praktische Studien verifiziert hat [203]. Er fand heraus, dass eine Vielzahl von Proteinen durch Sinken oder Anstieg des pH-Wertes des Lösungsmittels auf diese mikroskopischen Veränderungen im wässrigen System mit einer Entfaltung reagiert. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden in dieser Arbeit (relevante) die pH-Effekte auf die Konformation mittels IR-Spektroskopie und im Anschluss auf die Aktivität durch Messung der thermischen Hysteresis mittels Sonokristallisation des AFP Typ III untersucht.

Abbildung 5-7 zeigt IR-Spektren vom AFP Typ III mit der Massenkonzentration von 3 mg/mL bei pH-Werten (a) 5,2, (b) 6,2, (c) 7,4 und (d) 8,2.

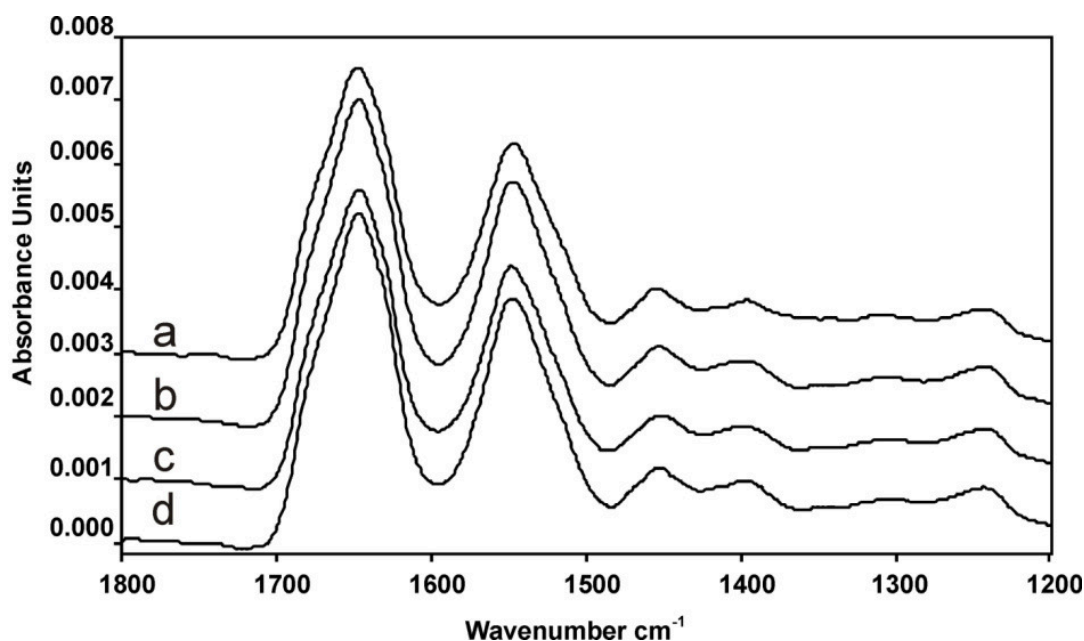


Abbildung 5-7: IR-Spektren des AFP Typ III (0,4 mM) bei verschiedenen pH-Werten: (a) 5,2, (b) 6,2, (c) 7,4 und (d) 8,2 unter Verwendung von Phosphatpuffer nach Sørensen und ohne weitere Zusatzstoffe.

Beim Vergleich der für die Peptidbindung charakteristischen Amid I-, II- und III-Bande in IR-Spektren (Abbildung 5-7) stellt man keine Änderung in der Peak-Form, Peak-Intensität und in der Peak-Lage fest. Bei integrierten Absorptionsflächen der Amid I- und Amid-II-Banden sind ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Darstellung der integrierten Absorptionsflächen der Amid I- und Amid-II-Banden des AFP Typ III in pH-Abhängigkeit.

AFP Typ III bei verschiedenen pH-Werten	Integrierte Absorptionsfläche (-) der Amid-I-Bande 1650 cm^{-1} (peak region $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$)	Integrierte Absorptionsfläche(-) der Amid-II-Bande 1550 cm^{-1} (peak region $1592 - 1500\text{ cm}^{-1}$)
5,2	1085,7	605,6
6,2	1071,2	590,2
7,4	1083,7	581,5
8,2	1094,9	599,3

Um den pH-Einfluss auf die Sekundärstrukturänderungen betrachten zu können, wurden die Sekundärstrukturanteile mittels PLS ermittelt und in Abbildung 5-8 in pH-Abhängigkeit dargestellt. Hier ist auffallend, dass der α -Helix-Anteil und der β -Faltblatt-Anteil bei verschiedenen pH-Werten konstant bleiben (Abbildung 5-8 A) und dass das dynamische Konformationsgleichgewicht sich in diesem pH-Bereich nicht ändert.

Um die strukturelle Stabilität des dynamischen Gleichgewichts des AFP Typ III über die Bestimmung der thermischen Hysterese zu verifizieren, wurde die thermische Hysterese in Abhängigkeit vom pH-Wert mithilfe der Sonokristallisation bestimmt. Somit wurde die thermische Hysterese (THA) bei einem pH = 5,2 von $0,24 \pm 0,019\text{ }^{\circ}\text{C}$, gemessen; bei einem pH 6,2 von $0,25 \pm 0,011\text{ }^{\circ}\text{C}$, bei pH 7,4 von $0,24 \pm 0,012\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei pH 8,2 von $0,24 \pm 0,010\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anhand dieser Resultate liegt das stabile dynamische Gleichgewicht zwischen gefaltetem und entfaltetem AFP Typ III im pH-Bereich von 5,2 - 8,2. Erst bei extremen pH-Werten von 1 und 13 war eine entsprechende Verringerung in der thermischen Hysterese von 20 % bzw. 27 % zu detektieren Chao [204]. Ursache für die pH-induzierte Sekundärstrukturveränderung der biologischen Systeme sind Änderungen der elektrostatischen Zustände der Aminosäure-Seitenketten.

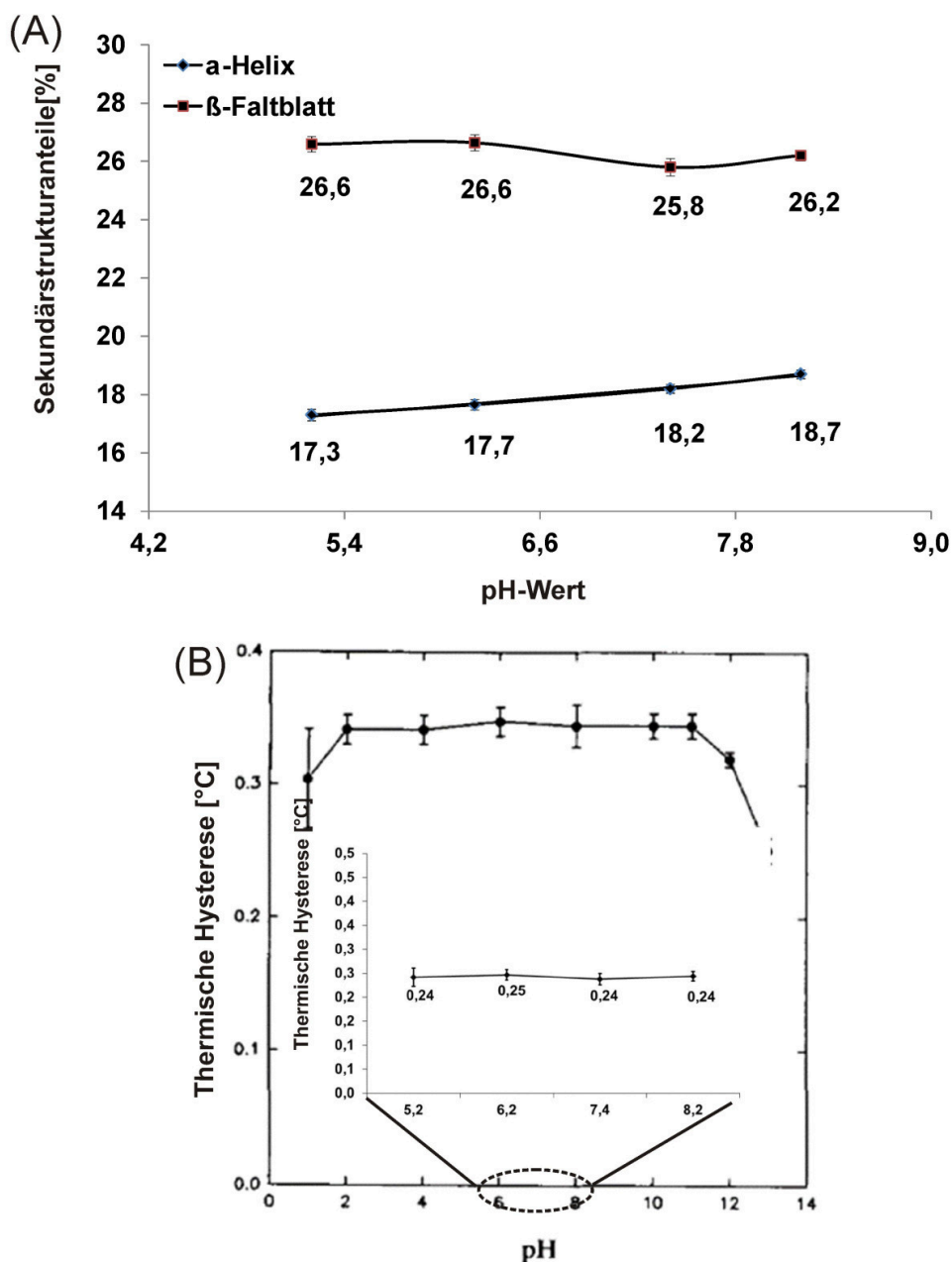


Abbildung 5-8: (A) Sekundärstrukturanteile des AFP Typ III in Abhängigkeit vom pH-Wert. (B) Thermische Hysterese des AFP Typ III in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH-Bereich 5,2 - 8,2 eigene Messungen) im Vergleich zu Ergebnissen einer Studie von H. Chao et al. [204].

Die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse bezüglich der thermischen Hysterese im pH-Bereich von 5,2 - 8,2 wird nochmals durch die Studie von Chao et al. [204] bestätigt, wobei die eigene Messwerte der thermischen Hysterese um ca. 28 % niedriger sind. Diese Studie zeigt ferner, dass die dynamische Proteinfaltung im pH-Bereich von 5,2 - 8,2 im unveränderten Gleichgewicht bleibt und mit den Beobachtungen aus der Studie von Sönnichsen et al. von 1993 übereinstimmt [204], bei welcher mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie im pH-Bereich

von 4,8 - 8,0 keine signifikanten strukturellen Veränderungen beim AFP Typ III festgestellt wurden.

5.2 Protein an Polyurethan- und Goldoberflächen

5.2.1 Immobilisierung von HRP auf der Polyurethanoberfläche

5.2.1.1 O₂-Plasmabehandlung der PUR-Oberfläche

Die reaktionsträge Polyurethanoberfläche soll mithilfe der Atmosphärendruck-Plasmabehandlung für die Immobilisierung der Proteine vorbereitet werden. Eine Vorbereitung bedeutet in diesem Fall eine Einführung von reaktionsfähigen sauerstoffhaltigen Gruppen auf die PUR-Oberfläche durch eine O₂-Plasmabehandlung (Abbildung 5-9). Die O₂-Plasmabehandlung wurde mit einer Verfahrensgeschwindigkeit der Plasmadüse von 20 m/min und im Abstand von 8 mm durchgeführt. Um den Einfluss dieser O₂-Plasmabehandlung auf die PUR-Oberfläche zu untersuchen, wurden die Elementzusammensetzung der PUR-Oberfläche und die chemische Umgebung der Kohlenstoffe in der PUR-Oberfläche im aktivierten Zustand mittels Röntgen-Photoelektronenspektroskopie analysiert. Um Informationen über die chemische Umgebung der Kohlenstoffe an der PUR-Oberfläche nach der O₂-Plasmabehandlung zu erhalten, wird zunächst ein C 1s-Hauptpeak des Übersichtsspektrums in ein hochaufgelöstes C 1s-Spektrum umgewandelt.

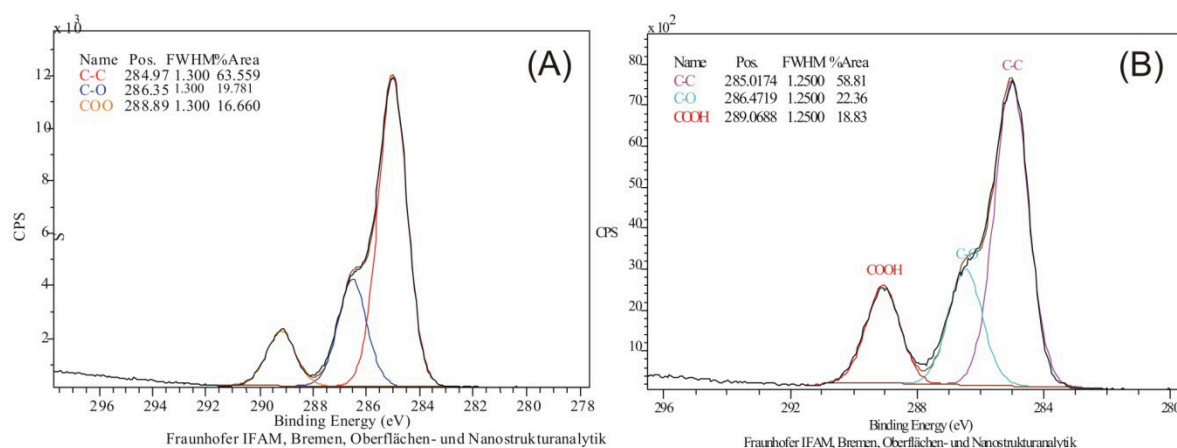


Abbildung 5-9: Hochaufgelöste und gefittete C 1s-Spektren von (A) unbehandelten und (B) plasmavorbehandelten PUR-Oberflächen auf dem Aluminiumsubstrat (2024) (FWHM, engl. Full Width Half Maximum).

Anschließend wird der C 1s-Peak in Sub-Peaks im Bindungsenergiebereich von ca. 280 - 290 eV mithilfe der mathematischen Fitting-Verfahren basierend auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate und der Gaußverteilung aufgespalten. Dadurch wird die quantitative XPS-

Analyse des hochaufgelösten C 1s-Spektrum anhand der unterschiedlichen Bindungszustände des Kohlenstoffs im Bindungsenergiebereich von 280 – 290 eV ermöglicht (Tabelle 20).

Tabelle 20: Bindungsenergien der möglichen funktionellen Gruppen des Kohlenstoffatoms.

Chemische Gruppen im Polymer	C 1s-Orbital			
	C_x-C_y	$\begin{array}{c} \\ -C- \\ \end{array} OH$	$\begin{array}{c} \\ C=O \\ \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ C=O \\ \\ OH \end{array}$
Bindungsenergie in [eV]	285,00	286,61	287,69	289,22
weitere mögliche funktionelle Gruppe	---	Ether-, Peroxid-, Epoxidgruppen	Keto-, Aldehyd-, Epoxidgruppe	Estergruppe

Um Indizien quantitativen Charakters nach einer O₂-plasmainduzierte Funktionalisierung der PUR-Oberfläche zu erhalten, werden die Elementarzusammensetzungen der oberflächennahen Polymerschicht der nicht plasmabehandelten und der O₂-plasmabehandelten PUR-Probe durch die Integration der jeweiligen Element-Intensitäten (Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff) im Übersichtsspektrum berechnet. Die daraus resultierenden Elementgehalte in prozentualer Atomkonzentration werden in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Mit XPS gemessene Elementarzusammensetzung der PUR-Probe mit und ohne Plasmaaktivierung.

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	S 2p
Bindungsenergie in [eV]	530,01	397,51	282,51	166,01
Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]				
PUR	21,82	3,26	74,80	0,12
PUR + O ₂ -Plasma	25,07	6,43	68,14	0,35

Nachweisempfindlichkeit der Methode ist elementspezifisch und liegt in der Größenordnung 0,1 at%.

Bei der quantitativen Analyse der elementaren Zusammensetzung der O₂-plasmabehandelten PUR-Oberfläche im Vergleich zur nicht plasmabehandelten PUR-Probe ist zu erkennen, dass die O₂-Plasmabehandlung zu einer signifikanten Abnahme der Kohlenstoffkonzentration um 9,8 % mit einem Kohlenstoffgehalt von 68,14 Atom-% der plasmabehandelten PUR-Probe im Vergleich mit einem Kohlenstoffgehalt von 74,80 Atom-% der nicht plasmabehandelten PUR-Probe führt. Diese Tatsache ist vermutlich auf den plasmainduzierten Degradationsvorgang der oberen Moleküllagen der Polyurethanoberfläche nach der O₂-Plasmabehandlung zurückzuführen (Abbildung 5-10).

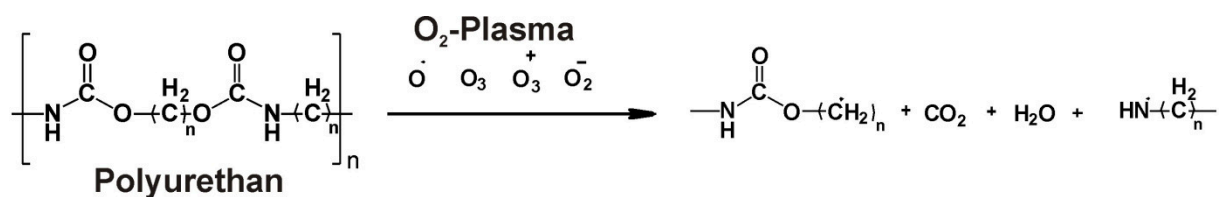


Abbildung 5-10: Reaktionsgleichung zur Degradation eines Polyurethans durch O₂-Plasmabehandlung (Abgewandelt von [205]).

Die Abbildung 5-10 zeigt schematisch einen plasmainduzierten Degradationsvorgang eines Polyurethans durch die O₂-Plasmabehandlung. Während der O₂-Plasmabehandlung der Polyurethanoberflächen können Reaktionen von Sauerstoffspezies des Plasmas mit dem Kohlenstoff und dem Wasserstoff in der Polyurethan-Matrix unter Ausbildung von typischen Reaktionsprodukten wie CO₂ und H₂O stattfinden, die als flüchtige Gase entfernt werden [205]. Infolgedessen ist anzunehmen, dass die signifikante Abnahme der Kohlenstoffkonzentration der plasmabehandelten PUR-Probe auf die thermische Degradationsprozesse des Materials zurückzuführen ist.

Weiterhin ist auffallend, dass die Sauerstoffkonzentration der plasmabehandelten PUR-Probe, mit einem Sauerstoffgehalt von 25,07 Atom-%, im Vergleich zur nicht plasmabehandelten PUR-Probe, mit einem Sauerstoffgehalt von 21,82 Atom-%, um 13 % zunimmt (Tabelle 21 und Abbildung 5-9). Ein Teil dieser Steigerung der Sauerstoffspezies ist höchstwahrscheinlich auf die Freilegung der hydrophilen Polyacrylate in der Polyurethan-Matrix durch den plasmabedingten Degradationsprozess zurückzuführen, während die Hauptmenge der eingeführten Sauerstoffspezies in der PUR-Matrix dem Oxidationsprozess zugesprochen werden können [206].

Außerdem ist eine signifikante Zunahme des Stickstoffanteils von 3,26 Atom-% bei nicht plasmabehandelten PUR-Probe auf 6,43 Atom-% bei der O₂-plasmabehandelten PUR-Probe detektierbar. Die Einführung dieser sauerstoffhaltigen Spezies auf der reaktionsträgen PUR-Oberfläche ermöglicht weitere Funktionalisierungsschritte, z. B. den Silanisierungsprozess.

5.2.1.2 Interpretation der Silanisierung der O₂-plasmabehandelten PUR-Oberfläche

Nach der O₂-Plasmabehandlung wurden die durch den Plasmaprozess eingeführten sauerstoffhaltigen Spezies beim Silanisierungsvorgang nach dem beschriebenen/dargestellten Reaktionsmechanismus umgesetzt (Abbildung 5-11). Der Silanisierungsvorgang wurde mit aminobasierten Trialkoxysilanen unter Verwendung von (3-Aminopropyl)trimethoxysilan durchgeführt, mit dem Ziel eine aminofunktionalisierte PUR-Oberfläche zu generieren. Hier-

zu wird die plasmabehandelte PUR-Probe mit der vorhydrolysierten 5 %-(v/v) APTMS-Lösung behandelt.

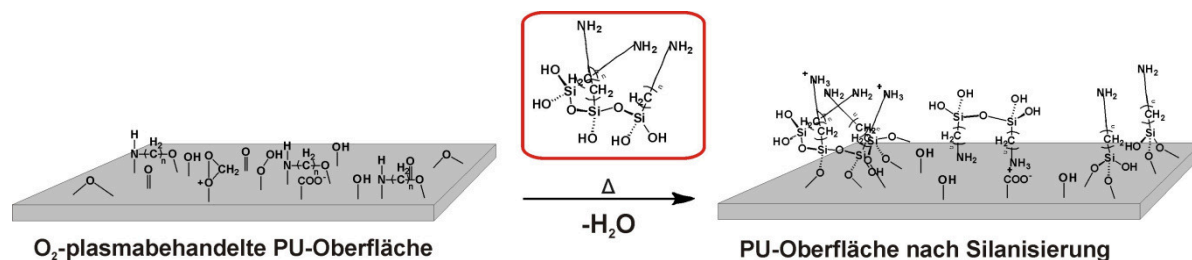


Abbildung 5-11: Postulierter Reaktionsmechanismus mittels vorhydrolysierten aminobasierten Trialkoxysilanmonomeren (rot umrandet) auf der O_2 -plasmabehandelten Polyurethanoberfläche.

Um die Einführung der aminofunktionellen Gruppen auf der O_2 -plasmabehandelten PUR-Oberfläche zu analysieren, wurde die Röntgen-Photoelektronenspektroskopie als oberflächenanalytische Methode verwendet.

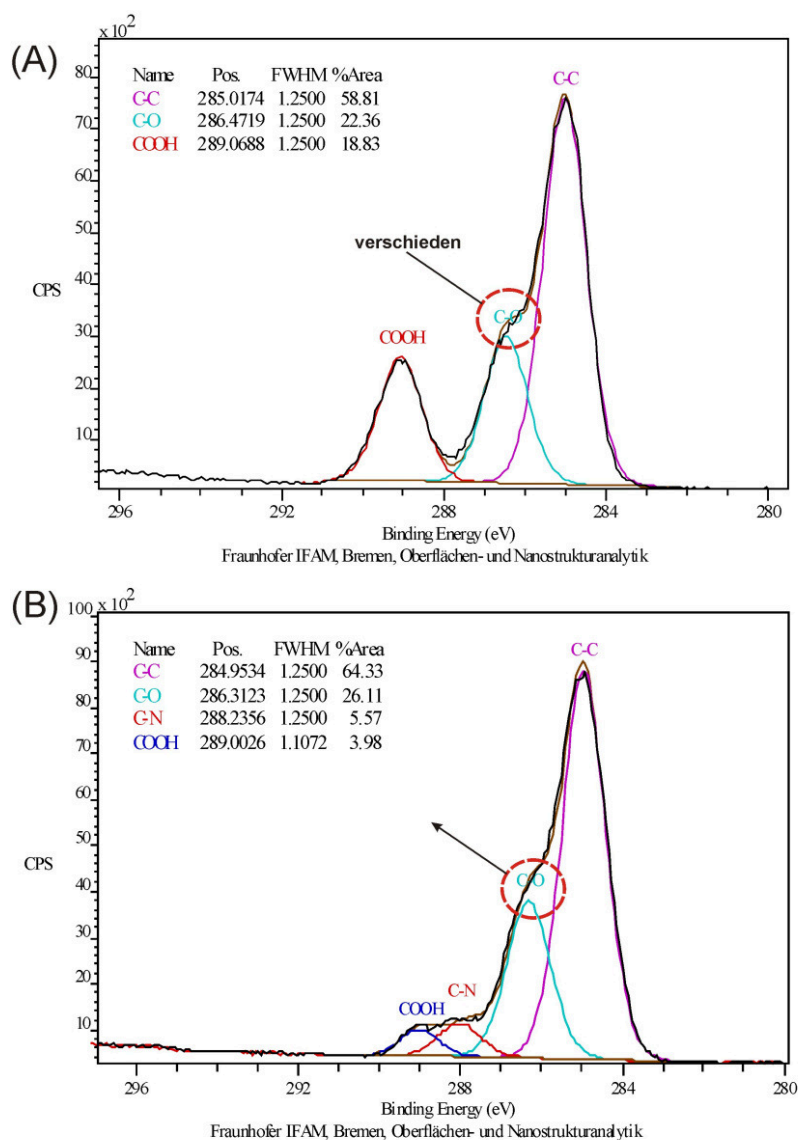


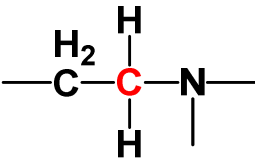
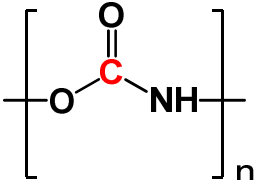
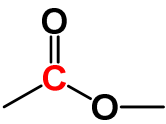
Abbildung 5-12: Hochaufgelöste und gefittete C 1s-Spektren der O₂-plasmabehandelten PUR-Probe (A) und der mit APTMS behandelten + O₂-plasmabehandelten PUR-Oberfläche (B) (Trägermaterial: Aluminiumlegierung 2024).

Zur Zuordnung der Bindungszustände des Kohlenstoffs wurden hochaufgelöste Spektren im BE-Bereich von 293 eV bis 280 eV aufgenommen. Mittels einer Fit-Analyse wurden drei bis vier Peaks erzeugt (Abbildung 5-12). Der erste Peak bei ca. 285 eV entspricht der aliphatischen Kohlenstoffverbindung (C-C). Der zweite Peak bei 286,34 eV ist auf die mit dem basischen Sauerstoff gebundene Kohlenstoffspezies (C-O) zurückzuführen. Und der dritte Peak bei ca. 289 eV wird der Carboxylgruppe und der Estergruppe zugeordnet. Beim Betrachten der hochaufgelösten Spektren der PUR-Probe nach O₂-Plasmabehandlung (A) mit einer C-C-Peakfläche von 59 % und nach der Silanisierung mit einer C-C-Peakfläche von 64 % (B) ist eine Steigerung der C-C-Peakfläche zu erkennen, die auf die Einführung der aliphatischen

Kohlenstoffverbindungen nach der Silanisierung zurückzuführen ist. Des Weiteren ist auffallend, dass die C-O-Peakfläche der silanisierten O₂-plasmabehandelten PUR-Probe bei der Bindungsenergie von 286,3 eV im Vergleich zur O₂-plasmabehandelten PUR-Probe, die Hydroxyl-, Ethergruppe repräsentieren, von 22 % auf 26 % zunimmt (Abbildung 5-12). Diese Zunahme gilt als ein Indiz für das Vorhandensein der Silylether-Verbindungen des APTMS an der O₂-plasmabehandelten PUR-Oberfläche.

Als Nächstes ist deutlich zu erkennen, dass im Spektrum B (Abbildung 5-12) das Auftreten eines neuen C 1s-Peaks bei einer Bindungsenergie von 288,2 eV zu detektieren ist, welcher dem Kohlenstoff in der Amid-Verbindung zugeordnet wird [207], [208]. Das Auftreten eines neuen C 1s-Peaks weist vermutlich auf die Einführung der aminofunktionellen Gruppen nach der Silanisierung hin. Dieser Befund kann anhand der Literaturdaten in der Tabelle 22 verdeutlicht werden.

Tabelle 22: Bindungsenergien der möglichen funktionellen Gruppen des Kohlenstoffatoms.

Chemische Gruppen	C 1s-Orbital		
			
Bindungsenergie in [eV]	288,2 [208]	289,4 [209]	289, [209]

Weiterhin ist zu erkennen, dass die COO-Peakfläche bei einer Bindungsenergie von 289 eV, welche entweder der Estergruppe der Urethangruppe im Polymerrückgrat des Polyurethans oder der durch O₂-Plasmabehandlung eingeführten sauren Sauerstoffspezies zugeordnet wird, der silanisierten PUR-Probe mit einer COO-Peakfläche von 19 % auf 4 % im Vergleich zur O₂-plasmabehandelten PUR-Probe um 78,9 % signifikant abnimmt.

Eine mögliche Erklärung für die drastische Abnahme der Estergruppen des Polyurethans ist, dass diese aufgrund einer wachsenden Silikat-Schicht nun außerhalb der XPS-Informationstiefe von ca. 10 nm liegen und deswegen weniger stark detektiert werden. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass eine zu erwartende Kondensationsreaktion zwischen der Carboxylgruppe der Oberfläche und den OH-Gruppen des Silans unter Ausbildung einer Silylether-Bindung sowie die Kondensationsreaktion zwischen der Carboxyl- und der primären Aminogruppe des Silans abläuft.

Um weitere Hinweise über die Einführung der stickstoffhaltigen und siliziumhaltigen Verbindungen auf der O₂-plasmabehandelten PUR-Oberfläche zu erhalten, werden zunächst Veränderungen in der Elementarzusammensetzung der oberflächennahen Polyurethan-Schicht in der Tabelle 23 betrachtet. Dabei wird der Elementgehalt in prozentualer Atomkonzentration angegeben.

Tabelle 23: Mit XPS gemessene Elementarzusammensetzung.

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	S 2p		
Bindungsenergie in [eV]	529,51	397,01	282,01	165,01		
<u>Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]</u>						
PUR	21,16	3,58	75,08	0,16		

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	S 2p		
Bindungsenergie in [eV]	530,01	397,51	282,51	166,01		
<u>Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]</u>						
PUR + O ₂ -Plasma	25,07	6,43	68,14	0,35	---	---

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	S 2p	F 1s	Si 2p
Bindungsenergie in [eV]	529,01	397,01	282,01	166,01	687,01	99,51
<u>Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]</u>						
PUR + O ₂ -Plasma + 5 % (v/v)-APTMS	25,10	7,61	56,50	---	1,89	8,52

Nach der Durchführung der Silanisierung auf der O₂-plasmabehandelten PUR-Probe ist eine signifikante Veränderung in der Elementzusammensetzung im Vergleich zu der O₂-plasma-behandelten Probe zu beobachten. Es ist eine Steigerung des Stickstoffgehaltes von 6,43 Atom-% auf 7,61 Atom-% der silanisierten PUR-Probe im Vergleich zur O₂-plasmabehandelten PUR-Probe festzustellen. Diese Steigerung des Stickstoffatomanteils gibt einen Hinweis auf die eingeführten stickstoffhaltigen Gruppen.

Um eine spezifische Immobilisierung über die Quervernetzung nach dem Mechanismus der Reaktion zwischen Polyglutaraldehyd und reaktiven Aminogruppen der Oberfläche sowie des Proteins ablaufen zu lassen, sind vor allem reaktive primäre Aminogruppen erforderlich (Abbildung 2-11). Nach der O₂-Plasmabehandlung werden saure sauerstoffhaltige Gruppen wie Carboxylgruppen auf der PUR-Oberfläche eingeführt. Durch die Anwesenheit dieser sauren Gruppen können primäre Aminogruppen des Silans im Rahmen einer Säure-Base-Reaktion protoniert werden (Abbildung 5-13 A). Außerdem ist es bekannt, dass Silanole mögli-

cherweise ebenfalls einen Einfluss auf die Protonierung der Aminogruppen des Organosilans haben und demzufolge Aminosiloxan-Salze bilden [210], [211] (Abbildung 5-13 B).

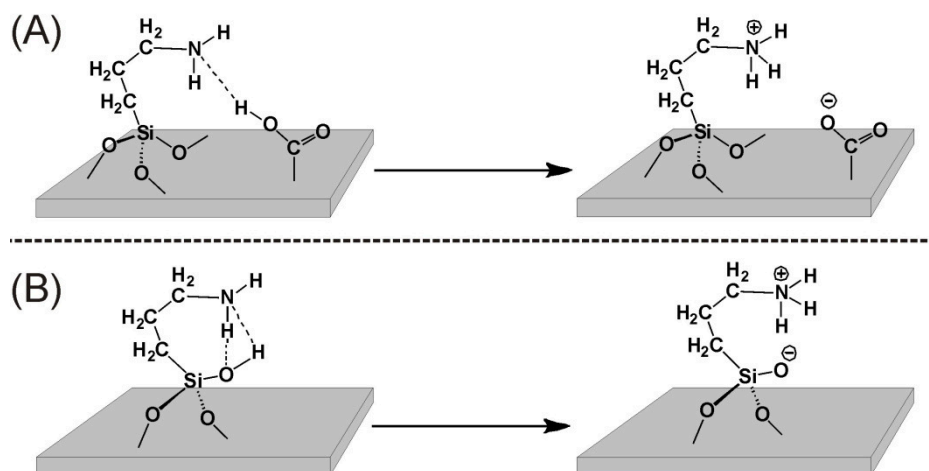


Abbildung 5-13: Intermolekulare Protonierung der Aminogruppe des APTMS durch die Carboxylgruppe auf der O₂-plasmabehandelten PUR-Oberfläche (A) und intramolekulare Protonierung der Aminogruppe des APTMS durch saure Silanolgruppen (B).

Zur Charakterisierung des chemischen Vorliegens der Aminogruppe wurde anhand der Literaturdaten die Tabelle 24 erstellt, die bei der Auswertung von XPS-Daten als eine Stütze dienen soll. In diesem Zusammenhang berichten Zhenghe Xu et al. [212] in ihrer XPS-Studie über das Vorhandensein protonierter Aminogruppen und nicht protonierter Aminogruppen von 0,83 Atom% bei einer BE = 399,4 eV des Aminosilans, welche auf dem γ -Fe₂O₃ aus dem Toluol abgeschieden wurden.

Der steigende Protonierungsgrad der primären Aminogruppen auf der Oberfläche mit einer zunehmender Basizität (43,32 % an Protonierung von Aminosilan auf der Silikon- und Titan-Oberfläche) zeigt die signifikante Säure-Base-Reaktion, welche den Silanisierungsgrad und die Orientierung der Silanmoleküle auf der Oberfläche beeinflussen können [212].

Tabelle 24: Bindungsenergien der möglichen funktionellen Gruppen des Kohlenstoffatoms [212].

N 1s-Orbital			
Chemische Gruppen			
Bindungsenergie in [eV]	400,0	399,4	401,3

In der Abbildung 5-13 (A) wird zunächst ein hochaufgelöstes N 1s der O₂-plasmabehandelten PUR-Probe dargestellt, in welchem eine Stickstoff-Photolinie bei 400,2 eV detektiert ist. In der Literatur wird eine Bindungsenergie von 400 eV für die Urethangruppe angegeben. Somit

stimmt die Peakposition, welche die Urethangruppe im Polymerrückgrat des Polyurethans charakterisiert von 400,2 eV mit dem Literaturwert ziemlich genau überein. Einige Aminogruppen können ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen untereinander oder mit den Hydroxygruppen des Substrates ausbilden; dies wird durch die Anwesenheit einer Schulter bei 400,7 eV festgehalten. Dieser Zustand der Aminogruppe wird im Rahmen dieser Dissertation bei der Auswertung des hochaufgelösten N 1s-Spektrum nicht betrachtet, weil diese Art des Fittings auf die XPS-Fittinggrenze mit einer Bindungsenergie von 0,7 eV zwischen zwei verschiedenen Verbindungen stößt und somit genau an der Grenze liegt.

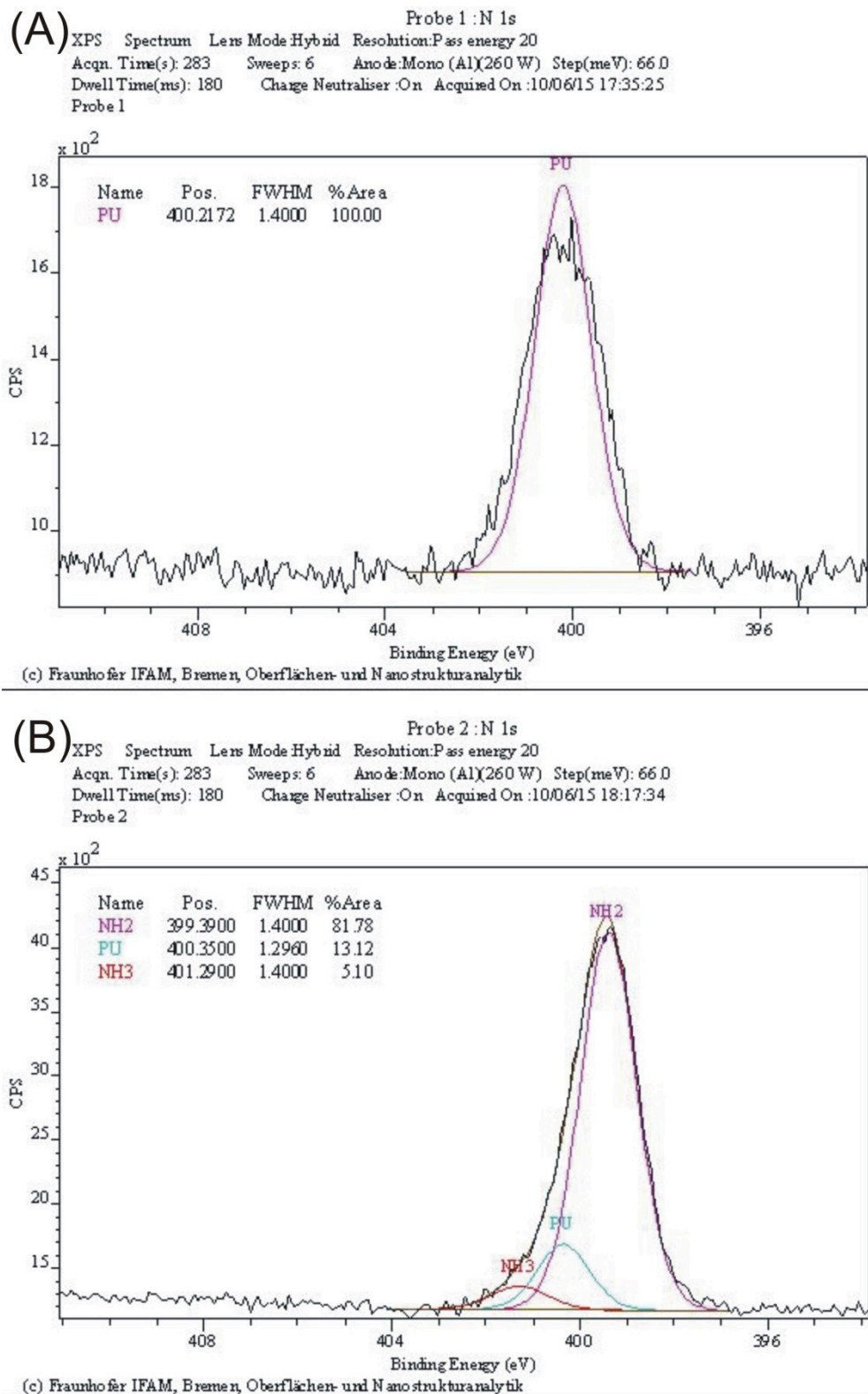


Abbildung 5-14: Hochaufgelöste und gefittete N 1s-Spektren der O₂-plasmabehandelten PUR-Oberfläche (A) und der APTMS-behandelten + O₂-plasmabehandelten PUR-Probe (B).

In der Abbildung 5-14 (A) wird ein hochaufgelöstes N 1s-Spektrum der O₂-plasmabehandelten PUR-Probe nach der Silanisierung unter Verwendung von APTMS dargestellt. Der erste Peak bei 399,39 entspricht den unprotonierten Aminogruppen [212]. Der zweite bei 400,35 ist

auf die Urethangruppe im Polymerrückgrat der PUR-Probe zurückzuführen. Der dritte Peak bei 401,29 eV wird der protonierten Aminogruppe zugeordnet. Das Auftreten der protonierten Aminogruppen mit der NH_3^+ -Peakfläche von 5 % weist auf eine Säure-Base-Wechselwirkung zwischen den primären Aminogruppen des Silans und den sauren sauerstoffhaltigen Gruppen hin.

Nichtsdestotrotz wurde eine Stickstoffatomkonzentration der freien primären Aminogruppen von 6 Atom-% bezogen auf den gesamten Stickstoffgehalt von 7 Atom-% direkt nach dem Silanisierungsprozess durch Peakfit bestimmt (Tabelle 23).

Anschließend wurden die aminosilanisierten PUR-Proben für 24 h unter basischen Reaktionsbedingungen mit Glutaraldehyd (100 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4) ausgesetzt, um ungebundene Silane von der PUR-Oberfläche zu entfernen.

In der Abbildung 5-15 A ist die Abnahme der Si 2p-Peakintensität der silanisierten PUR-Probe nach 24 h Auslagerung in Phosphatpuffer im Vergleich zur Probe vor Auslagerung zu erkennen, welche das Abwaschen der nicht in die Silikat-Schicht einkondensierten Aminosilane zeigt.

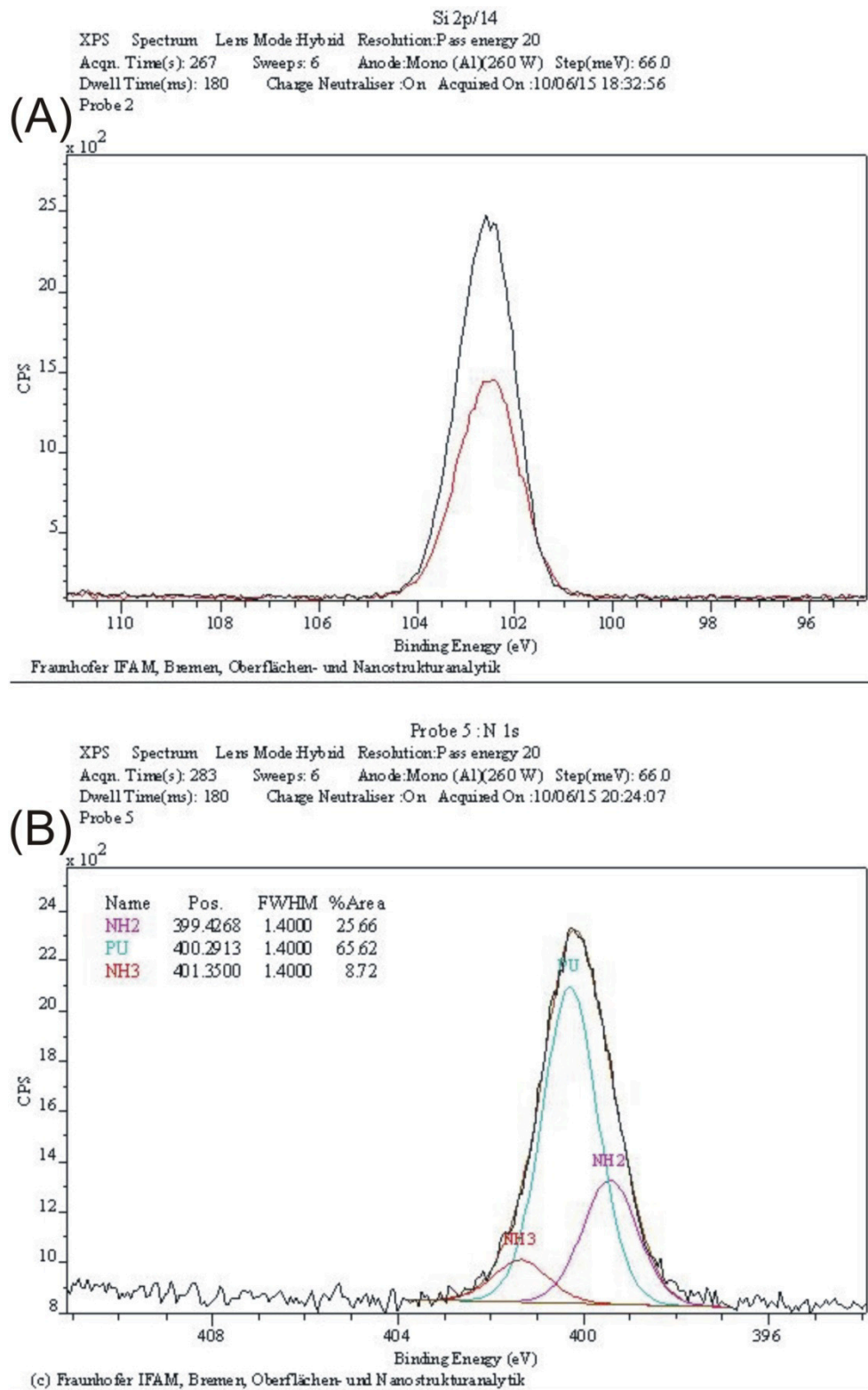


Abbildung 5-15: (A) hochaufgelöstes Si 1p-Spektrum der O₂-plasmabehandelten PUR- Probe nach der Silanisierung (schwarz) und anschließender 24-h-Lagerung in Phosphatpuffer (rot). (B) Hochaufgelöstes und gefittetes N 1s-Spektrum der O₂-plasmabehandelten PUR-Probe nach der Silanisierung und anschließender 24-h-Lagerung in Phosphatpuffer.

Ein weiterer Hinweis auf das Entfernen der aminofunktionalisierten Silikatschicht ist die Zunahme der Amidgruppe bei einer Bindungsenergie von 400 eV in dem hochaufgelösten N 1s-

Spektrum, die dem Polymerrückgrat des Polyurethans zuzuordnen ist. Trotz der Entfernung eines Teils der Silikatschicht befinden sich Aminogruppen auf der PUR-Oberfläche, die in einem protonierten oder einem nicht protonierten Zustand vorliegen. In der elementaren Zusammensetzung zeigt sich die Abnahme in der Siliziumatomkonzentration um 23,7 Atom% (Tabelle 25).

Tabelle 25: XPS-Elementarzusammensetzung von PUR + O₂-Plasma+5 %-(v/v)-APTMS und von PUR + O₂-Plasma+5 %-(v/v)-APTMS + 24 h Lagerung.

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	Si 2p		
Bindungsenergie in [eV]	529,01	396,51	282,01	99,51		
<u>Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]</u>						
PUR + O ₂ -Plasma						
+ 5 %-(v/v)-APTMS	25,27	8,76	56,50	9,47		

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	Si 2p	P 2p	Fe 2p
Bindungsenergie in [eV]	528,51	397,01	282,01	99,51	130,10	708,51
<u>Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]</u>						
PUR + O ₂ -Plasma + 5 %-(v/v)-APTMS + 24 h Lagerung	27,94	6,05	55,15	9,05	1,00	0,50

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Silikatschichten ist die hohe Hydrolyseinstabilität der Si-O-C Derivate [213]. Demzufolge ist nicht ausgeschlossen, dass aufgrund der Hydrolyseinstabilität COO-Si Bindungen aufgebrochen werden und dies somit für eine Abnahme der Siliziumkonzentration verantwortlich ist.

5.2.1.3 PUR-PDMS-Systems und Plasmaaktivierung [214]

Der zweite Immobilisierungsansatz folgt einer Präparation und anschließender Druckluft-Plasmaaktivierung eines Polyurethan-Poly(dimethylsiloxan)Hybridpolymers (PUR-PDMS) mit dem Ziel durch Oxidation funktionelle Silanol-Spezies des PDMS in dem PUR-Film zu erzeugen (Abbildung 2-10).

Um die molekulare Zusammensetzung eines migrierten Siloxan-Polyethers der obersten Atomlage eines PUR-PDMS-Festkörperoberflächen zu analysieren, wurde die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie als oberflächenanalytische Methode verwendet.

In der Abbildung 5-16 sind die ToF-SIMS-Spektren der PUR-Beschichtung im Massenbereich von 0 - 200 m/z mit und ohne PDMS dargestellt. Im Massenspektrum des PUR ohne PDMS (Abbildung 5-16 A) dominieren organische Fragmente in der Form $C_nH_m^+$, was einem typischen aliphatischen Polymer entspricht [59]. Dagegen beinhaltet das PUR mit 3 % (w/w) PDMS eine Sequenz von Fragment-Peaks bei m/z 28 (Si^+), m/z 43 ($SiCH_3^+$), m/z 73 ($Si(CH_3)_3^+$), m/z 147 ($Si_2C_5H_{15}O^+$), m/z 191 ($Si_3C_5H_{15}O_2^+$), m/z 207 ($Si_3C_5H_{15}O_3^+$), m/z 221 ($Si_3C_7H_{21}O_2^+$) und m/z 281 ($Si_4C_7H_{21}O_4^+$), welche den Polysiloxanen zugewiesen werden können. Diese spezifischen Siloxan-Peaks in Abbildung 5-16 (B) dominieren die organischen Peaks der Polyurethan-Matrix. Auch wenn die Methode nicht quantifizierend ist, kann aufgrund der stärkeren Signale und der geringen Oberflächenenergie von PDMS von einer Segregation und Anreicherung an der Oberfläche ausgegangen werden.

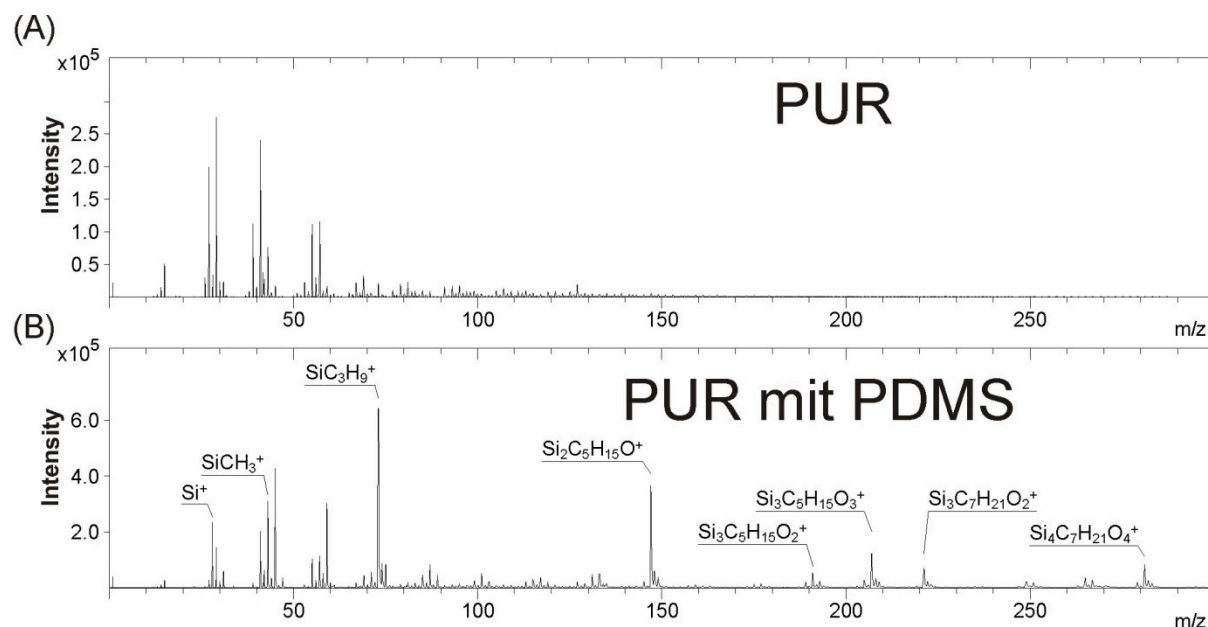


Abbildung 5-16: Modifikation der PUR-Beschichtung durch PDMS-Zusatz. Positive Ionen-ToF-SIMS-Massenspektren der Polymeroberflächen nach dem Härten: (A) reines PUR und (B) PUR mit 3 % (w/w) PDMS.

Um weitere Rückschlüsse über die Anreicherung des PDMS an der Oberfläche zu ziehen, wurden XPS-Übersichtsspektren von PUR ohne und mit PDMS aufgenommen, wobei die Informationstiefe (aufgrund der begrenzten Austrittstiefe der emittierten Elektronen) ca. 10 nm beträgt.

Die Tabelle 26 zeigt, dass nach der Zugabe von PDMS in das PUR-Gemisch, wie erwartet, eine signifikante Änderung in der elementaren Zusammensetzung auftritt. Insbesondere zeigen die 3,5 Atom-% Silizium auf der silikonhaltiger Probe eine Oberflächenanreicherung des Silikons.

Tabelle 26: Mit XPS gemessene Elementarzusammensetzung an der Oberfläche der PUR-Probe ohne und mit PDMS.

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	Si 2p
Bindungsenergie in [eV]	510,01	397,51	283,01	100,51
Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]				
PUR	21,85	3,26	74,89	-
PUR mit 3 % PDMS	19,72	3,38	73,39	3,52

Nach der Härtung des PUR-PDMS-Systems erfolgt die Atmosphärendruck-Plasmaaktivierung, um die Methylgruppen des PDMS in reaktive Silanolgruppen (Si-O_x) über die plasmainduzierte Oxidation umzuwandeln. Diese durch die Atmosphärendruck-Plasmaaktivierung generierten Silanol-Spezies können untereinander kondensieren und bilden eine siliziumdioxidähnliche Struktur in der äußeren Oberflächenschicht [215], [216].

Weiterhin wurde die Wirksamkeit der Plasmaaktivierung durch die Messung des Wasserkontaktwinkels und durch die Bestimmung der Oberflächenenergie nach der Methode Owens, Wendt, Rabel und Kaelble untersucht [168]. In der Abbildung 5-17 sind die Daten der Kontaktwinkelmessung und der Bestimmung der Oberflächenenergien zusammengefasst.

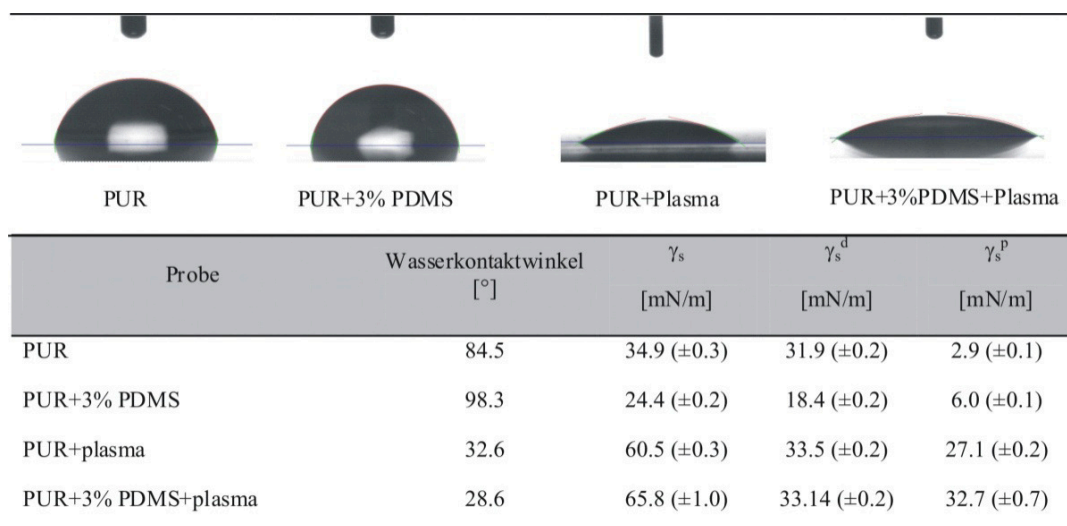


Abbildung 5-17: Darstellung des Wasserkontaktwinkels und der Oberflächenenergie γ_s mit dispersem γ_s^d - und polarem γ_s^p -Anteil der PUR-Beschichtung mit und ohne PDMS vor der Plasmabehandlung und nach der Plasmabehandlung (Test-Flüssigkeiten: Wasser, Diiodmethan und Ethylenglykol).

Als Erstes fällt auf, dass durch das Vermischen des PDMS mit PUR, wie erwartet, eine Abnahme der Oberflächenenergie des PUR ohne PDMS von 34 (±0,3) mN/m zu PUR mit PDMS auf 24 (±0,2) mN/m erfolgt, was ebenfalls als Indiz für die Migration und Anreicherung des PDMS an der PUR-Oberfläche gilt. Des Weiteren wird nach der Plasmabehandlung der PUR-

Beschichtung mit und ohne PDMS eine Erhöhung der Oberflächenenergie und damit eine Erhöhung des polaren Teils der Oberflächenenergie deutlich, welche für die Einführung der polaren Spezies sprechen. Um eine durch die Atmosphärendruck-Plasmaaktivierung induzierte funktionelle Veränderung an der PUR-PDMS-Oberfläche zu untersuchen, wurden hochaufgelöste Si 2p- und C 1s-XPS-Spektren aufgenommen (Abbildung 5-18).

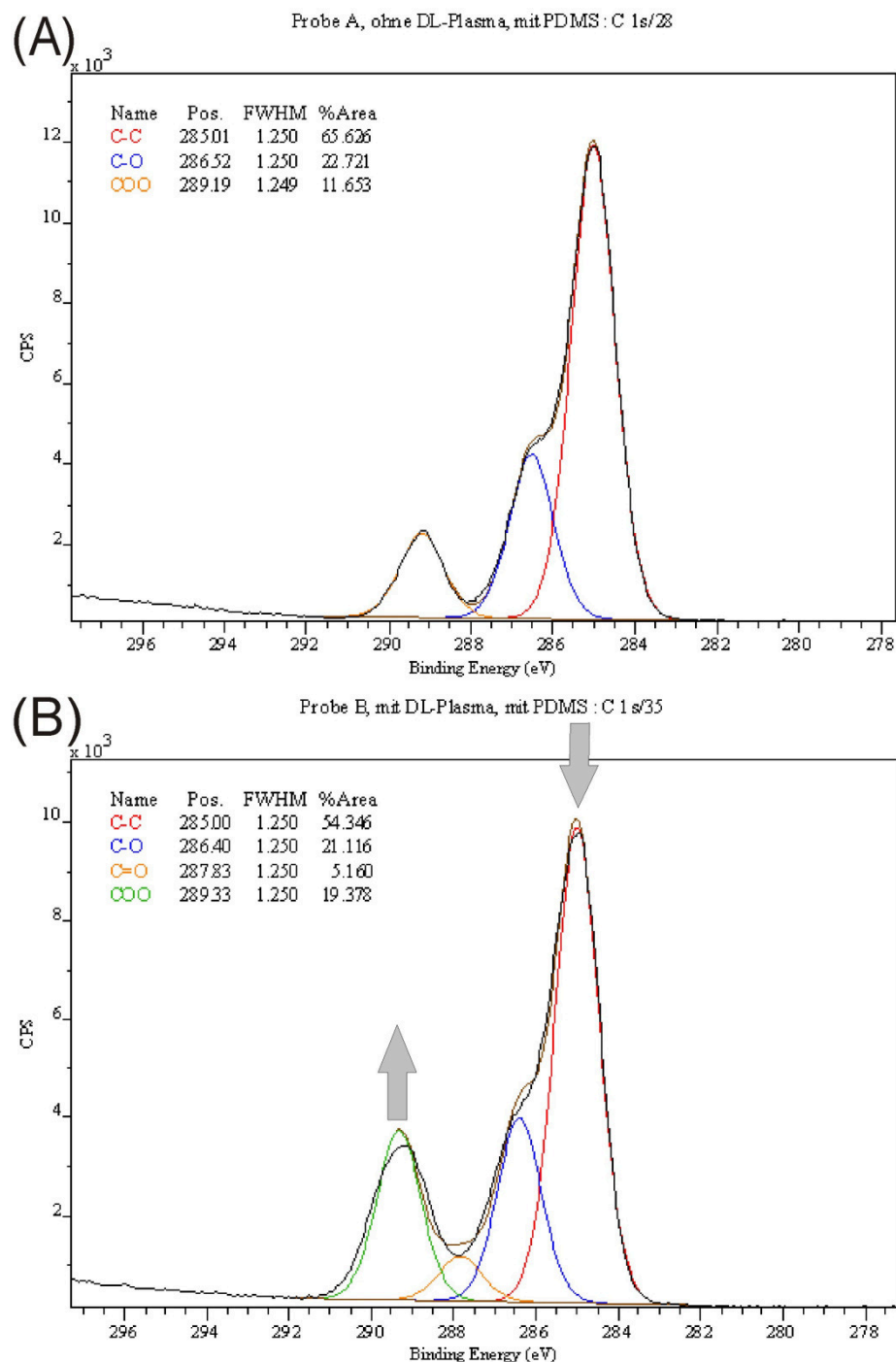


Abbildung 5-18: Hochaufgelöste C 1s-Spektren der PUR-Beschichtung mit 3 % (w/w) PDMS (A) vor und nach der Plasmabehandlung (B).

In der Abbildung 5-18 ist je ein hochaufgelöstes C 1s-Spektrum der nicht plasmabehandelten und der plasmabehandelten PUR-PDMS-Probe dargestellt. Der erste Peak bei 285 eV ist auf die aliphatischen Kohlenstoffverbindungen (C-C) zurückzuführen. Der zweite Peak bei 286 eV entspricht der sauerstoffgebundenen Kohlenstoffspezies (C-O) und der dritte Peak bei 289 wird der Estergruppe zugeordnet. Hier ist auffallend, dass das Signal von aliphatischen Kohlenstoffverbindungen (BE 285 eV) der plasmabehandelten PUR-Probe mit der C-C-Peakfläche von 54,3 % (Abbildung 5-18 B) um ca. 17 % im Vergleich zur nicht plasmabehandelten PUR-PDMS-Probe mit einer C-C-Peakfläche von 65,6 % (Abbildung 5-18 A) erniedrigt wird. Außerdem sind die Intensitäten der Carbonyl- (BE +3,0 eV) und Carboxylgruppen (BE +4,2 eV) nach der Plasmaaktivierung erhöht (Abbildung 5-18 B).

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass während der Plasmabehandlung eine Oxidation der PUR-PDMS-Oberfläche erfolgt, was im Einklang mit der gemessenen Hydrophilierung steht. Einen weiteren Hinweis über die funktionelle Veränderung der PUR-PDMS-Oberfläche nach der Plasmabehandlung liefert die Tabelle 27 mit der elementaren Zusammensetzung. Hier wird nach der Plasmabehandlung eine prozentuale Steigerung der Stickstoffkonzentration von 3,38 Atom-% der nicht plasmaktivierten Probe auf 8,24 Atom-% der plasmaaktivierten Probe und eine Steigerung des Sauerstoffs von 19,72 auf 29,67 Atom-% festgestellt (Tabelle 27). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Behandlung der PUR-PDMS-Oberfläche mit Druckluft als Prozessgas zum Einbau von sauerstoffhaltigen Gruppen führt.

Tabelle 27: Mit XPS gemessene Elementarzusammensetzung der PUR-PDMS vor und nach Plasmaaktivierung.

Photolinie	O 1s	N 1s	C 1s	Si 2p
Bindungsenergie in [eV]	530	398	283	100
<u>Elementarzusammensetzung [Atom Konz. %]</u>				
PUR + PDMS	19,72	3,38	73,39	3,52
PUR + PDMS + Plasma	29,67	8,24	59,23	2,27

Um den Bindungszustand des Siliziums näher zu untersuchen, wurden hochaufgelöste Si 2p-Spektren aufgenommen (Abbildung 5-19). Hier ist deutlich auffallend, dass sich die Lage der Silizium-Photolinie der nicht plasmabehandelten PUR-PDMS-Probe mit 102,31 eV von der plasmabehandelten PUR-PDMS mit einer Photolinie von 103,25 deutlich unterscheidet. Dieser Unterschied spiegelt sich in einer Verschiebung zu höheren Bindungsenergien um +0,9 eV

des Si 2p-Elektrons der plasmabehandelten PUR-PDMS-Probe wider und steht in direktem Zusammenhang mit der Ausbildung einer zusätzlichen Si-O-Bindung des organischen PDMS durch die Plasmabehandlung. Da aus der Literatur bekannt ist, dass das Si 2p-Elektron mit einer Bindungsenergie von ca. 103,4 eV von drei oder vier Sauerstoffatomen dem anorganischen Siloxan im Vergleich zum PDMS (zwei Kohlenstoffatom) mit einer Bindungsenergie von ca. 102,4 eV umgeben ist [217], ist davon auszugehen, dass bei der Plasmabehandlung auch anorganische SiO₂-Spezies in der oberflächennahen Polyurethan-Schicht generiert worden sind.

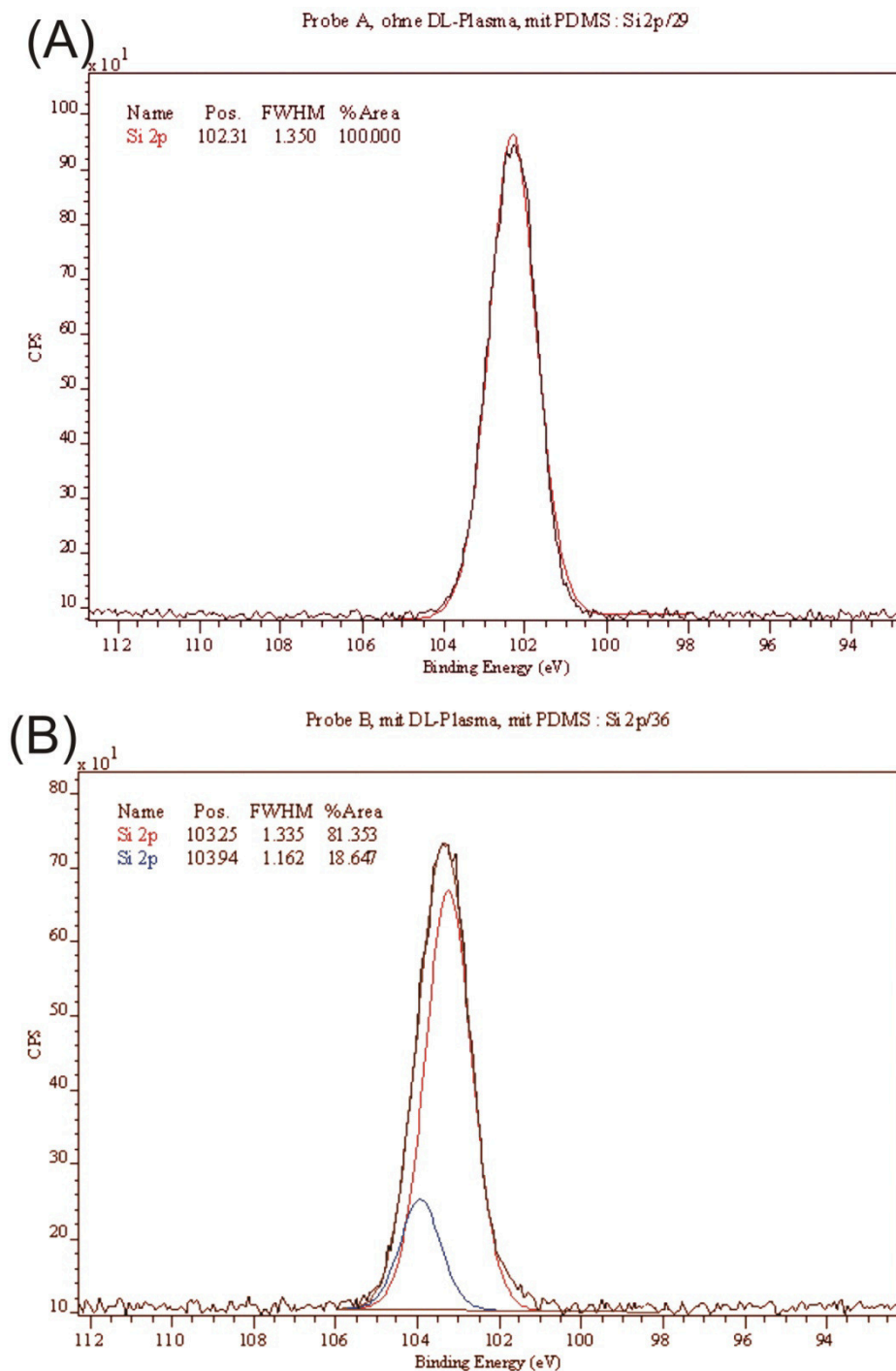


Abbildung 5-19: Hochaufgelöstes Si 2p-Spektren der PUR-PDMS-Probe ohne Plasmabehandlung (A) und mit Plasmabehandlung (B).

Durch XPS-Untersuchungen wurde gezeigt, dass Plasmabehandlung das oberflächennahe PDMS zu großen Teilen in oxidische Spezies umgewandelt hat. Demzufolge stellt diese Art der Oberflächenfunktionalisierung den Ausgangspunkt für eine weitere Funktionalisierung der PUR-PDMS-Oberfläche über die Pfropfreaktion mit funktionellen niedermolekularen Molekülen dar. In diesem Zusammenhang wird die plasmabehandelte PUR-PDMS-Oberfläche

mit APTMS (Kapitel 5.2.1.2) silanisiert und im Anschluss für die spezifische Immobilisierung mit Polyglutaraldehyd aktiviert.

5.2.1.4 Pfropfung des Glutaraldehydes auf der PUR-Oberfläche

Als abschließender Schritt der Immobilisierung erfolgt die Pfropfung des Glutaraldehydes auf der aminofunktionalisierten PUR-Oberfläche (Abbildung 5-20 A).

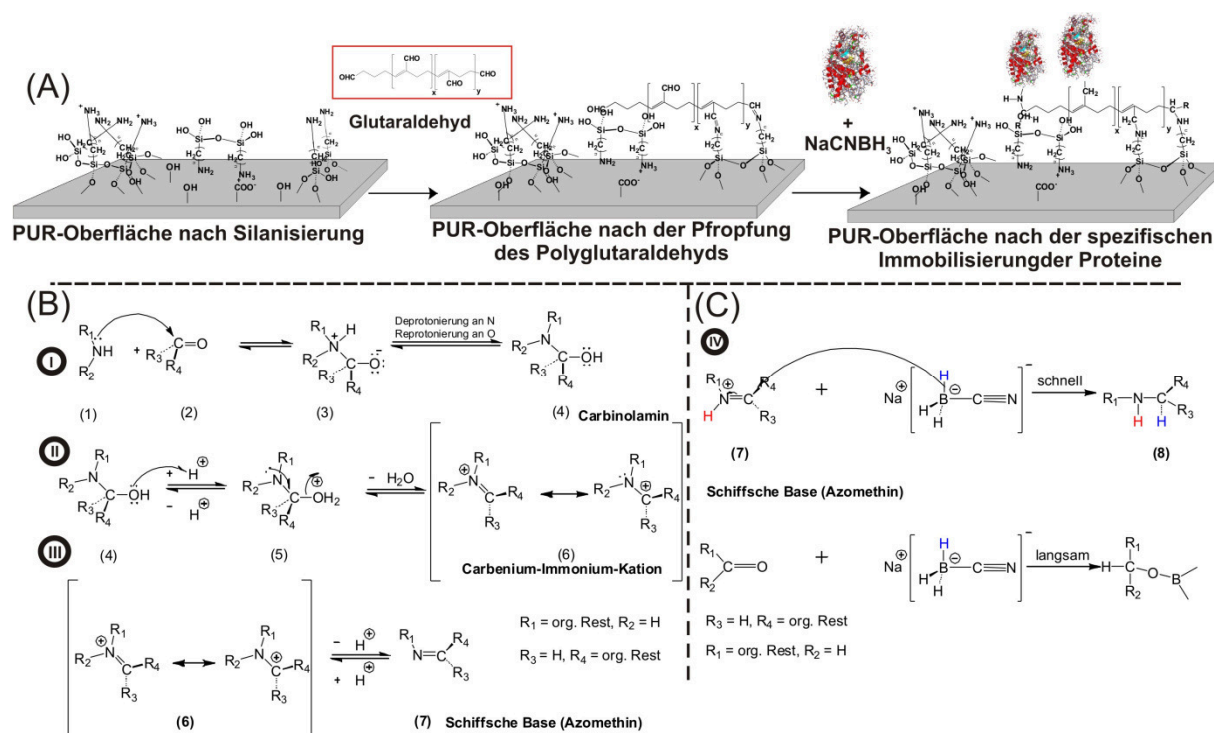


Abbildung 5-20: Immobilisierungsstrategie unter Verwendung des Glutaraldehydes unter basischen Bedingungen (A), Reaktionsmechanismus der Proteinimmobilisierung basierend auf nukleophiler Additions- und Kondensationsreaktion der primären Amino- und Carbonylgruppe (B) [218] und schematische Darstellung des Reduktionsschrittes der reduktiven Aminierung (C) [219].

Diese Immobilisierungsstrategie basiert auf der nukleophilen Additionsreaktion unter Ausbildung einer Schiff'schen Base (Abbildung 5-20 B), welche einer reduktiven Aminierung unterzogen wird. Wobei bei der reduktiven Aminierung ein besonderes Augenmerk auf das Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid gelegt wird. Hierzu gibt die schematische Darstellung in Abbildung 5-20 C den Reduktionsschritt der reduktiven Aminierung wieder, wobei Wechselwirkungen der Reaktanten, Intermediate und Produkte mit Natriumcyanoborhydrid vernachlässigt werden, zumal über die Vorgänge nur sehr wenig bekannt ist.

Bei dieser Immobilisierungsstrategie wurde die aminofunktionalisierte PUR-Oberfläche nach der Silanisierung mit Glutaraldehyd behandelt. Nach der Behandlung mit Glutaraldehyd wurde eine reduktive Aminierung unter Verwendung von Natriumcyanoborhydrid durchgeführt.

Im Anschluss wurden die durch Glutaraldehyd aktivierten PUR-Oberflächen mit dem zu immobilisierenden Enzym HRP inkubiert.

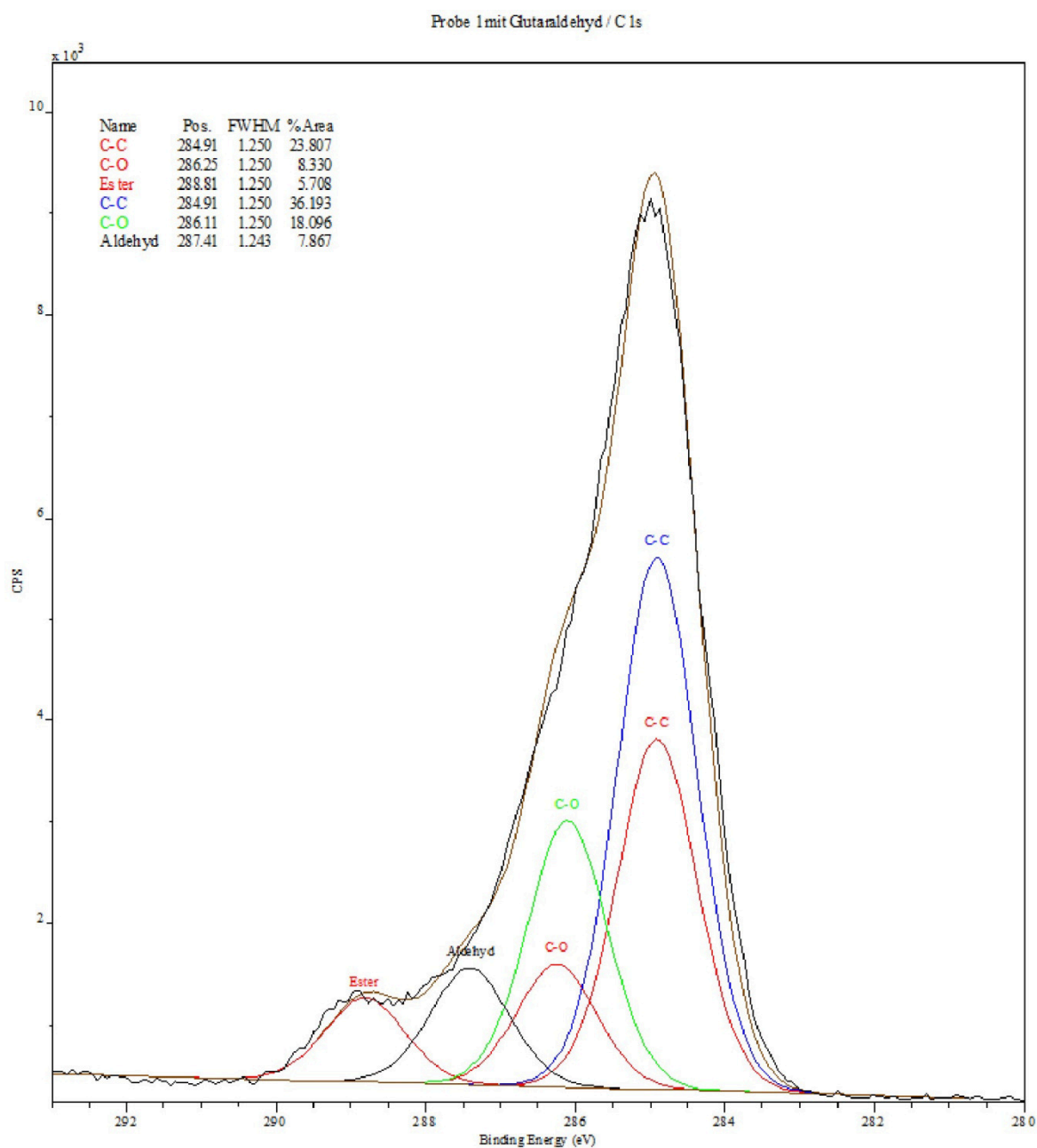


Abbildung 5-21: Hochaufgelöstes C 1s-Spektrum der aminosilanisierten und mit Glutaraldehyd behandelten PUR-Probe.

Um die Anbindung des Glutaraldehyds an der aminofunktionalisierten PUR-Oberfläche zu belegen, wurden die Sauerstoffbindungen visualisiert, indem die Kohlenstoffpeaks angepasst wurden. Hierzu werden in der Abbildung 5-21 für die verschiedenen C-O-Bindungen unterschiedliche chemische Verschiebungen angenommen und diese Kohlenstoffatome jeweils durch einen eigenen Peak angepasst. In der Abbildung ist das Auftreten eines Peaks bei einer Bindungsenergie von 286,11 eV zu erkennen, welcher einer primären Aldehydgruppe des

Glutaraldehyds zugeordnet werden kann. Daraus resultiert, dass sich die Aldehydgruppen an der aminosilanisierten Oberfläche befinden und zur spezifischen Immobilisierung der Meerrettichperoxidase über die nukleophile Addition und anschließende reduktive Aminierung fähig sind.

5.2.1.5 Untersuchung der katalytischen Aktivität der HRP [214]

Nach der spezifischen Anbindung des HRP-Enzyms unter Verwendung des Glutaraldehydes wurde die enzymatische Aktivität der immobilisierten Meerrettichperoxidase (HRP) durch die katalytische Oxidation des Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durchgeführt (Abbildung 5-22).

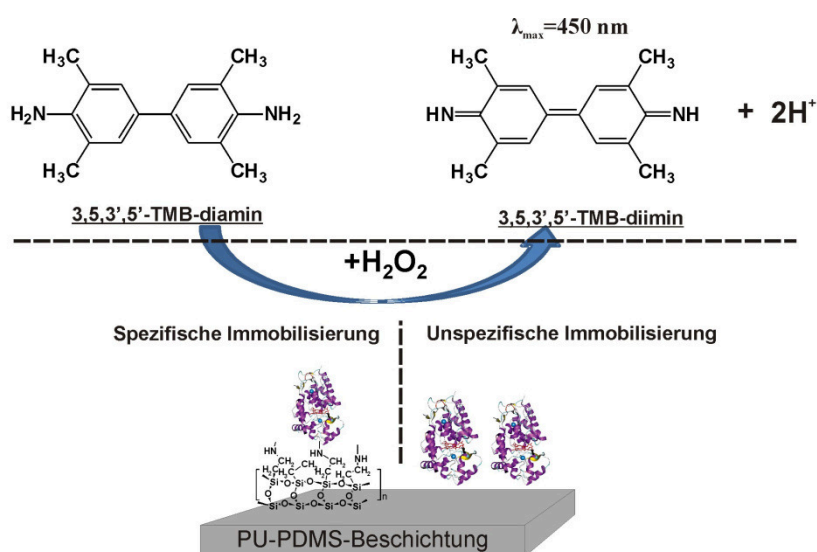


Abbildung 5-22: Reaktionsmechanismus der Oxidation des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins.

Dabei wurde die Aktivität der immobilisierten HRP bei sechs verschiedenen Proben getestet. Nach der Inkubation mit 1-Step Ultra-TMB-ELISA und dem Abbruch der katalytischen Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäure wurde das gesamte Lösung 1 mithilfe eines Mikropplatten-Lesegerätes bei einer Wellenlänge 450 nm vermessen.

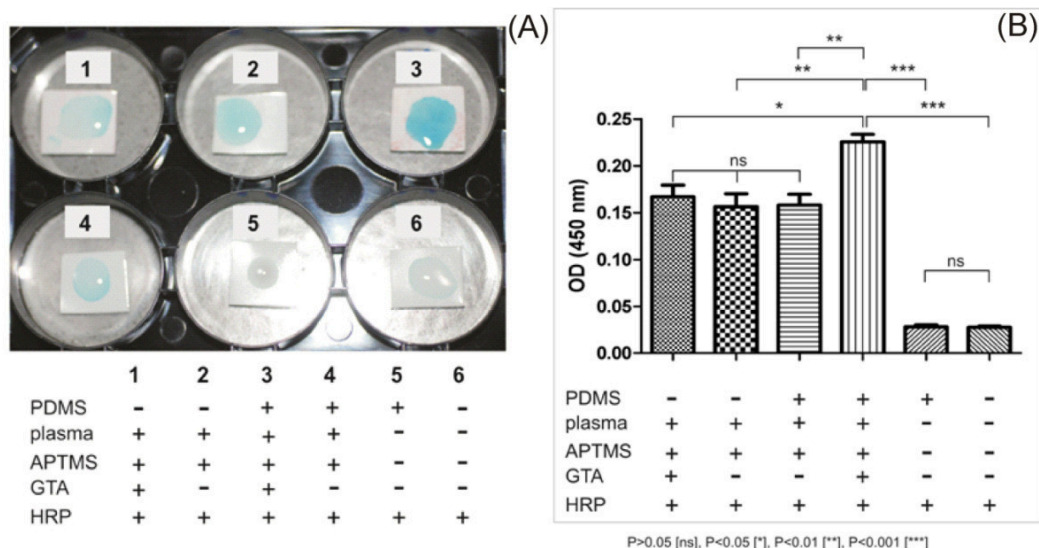


Abbildung 5-23: (A) und (B) quantitative Bestimmung der Enzymaktivität auf einer Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Abkürzungen: PDMS = 3 % (w/w) in der PUR-Beschichtung enthalten; Plasma = Behandlung der Beschichtung mit atmosphärischem Plasma-Jet-System; APTMS = Silanisierung der Oberfläche mit (3-Aminopropyl)trimethoxysilan; GTA = Anbindung der Enzym-HRP mit Glutaraldehyd; HRP = Kontakt der Meerrettichperoxidase mit der Oberfläche.

Die Daten in der Abbildung 5-23 B wurden als Mittelwerte \pm SD von Werten aus mindestens drei Experimenten präsentiert. Der * mit den horizontalen eckigen Klammern repräsentiert die signifikanten Unterschiede in der Aktivität der HRP zwischen den Proben, ermittelt mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Tests. Der Ausdruck „ $p > 0,05$ “ wurde als nicht signifikant (ns), $p < 0,01 - 0,05$ als signifikant angesehen (*), $p < 0,001 - 0,01$ als sehr signifikant (**) und $p < 0,001$ als extrem signifikant (***) eingestuft.

Die HRP-Aktivität der Probe 3 in der Abbildung 5-23 zeigt eine Signifikanz von 0,01 - 0,05, also deutlich höher im Vergleich zu den anderen Proben. Es ist vernünftig anzunehmen, dass die erhöhte HRP-Aktivität in erster Linie auf eine höhere Menge der immobilisierten HRP bei der betrachteten Proben-Oberfläche zurückzuführen ist. Außerdem gilt eine Anbindung eines Enzyms als stabilitätserhöhend, da die starre Molekülstruktur durch die Immobilisierung hervortritt und daher einer Konformationsänderungen der Biomoleküle widerstehen kann [64]. Dies unterstreicht die Probe 4, bei welcher das homobifunktionelle Vernetzungsmittel Glutaraldehyd weggelassen wurde, um auf den Unterschied zu der Probe 3 mit Glutaraldehyd aufmerksam zu machen. Man kann verschiedene Argumente für die höhere Enzymaktivität finden. Z. B., dass bei der Probe 3 mit Glutaraldehyd im Vergleich zu Probe 4 die katalytische Enzymaktivität um 27,3 % höher liegt.

Allgemein ist bekannt, dass in wässriger Umgebung verschiedene Ladungen der Metalloxyd-Oberflächen in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgebaut werden können. Dadurch ist es wahr-

scheinlich, dass die silanisierte Probe sich nicht in der Oberflächentopographie, sondern in der Oxidschichtbildung (z. B. Schichtdicke, chemische Zusammensetzung der Oxidschicht) von der nicht silanisierten Probe unterscheidet, welche höchstwahrscheinlich das Adsorptionsverhalten der Proteine bestimmt und die Orientierung der Proteine sowie deren Oberflächeneigenschaften beeinflussen kann. Anzumerken ist, dass bei der Bestimmung der enzymatischen HRP-Aktivität die adsorbierte Proteindichte nicht berücksichtigt wurde, welche bei verschiedenen Eigenschaften der verwendeten Oberflächen unterschiedlich ausfallen konnte und dadurch verschiedene Katalysegrade der HRP gegenüber dem Diamin zeigen konnte. Um dem *Lambert-Beersche-Gesetz* zu entsprechen, wird die Proteindichte auf der Gold-Oberfläche im Rahmen dieser Arbeit mithilfe der QCM-D-Methode quantifiziert. Durch diese der QCM-D-Methode eröffnet sich nicht nur der Weg aus analytischer Sicht, die adsorbierte Proteindichte zu quantifizieren, sondern sie ermöglicht in Kombination mit PM-IRRAS Informationen über Konformationsänderungen in den nanometerdünnen Proteinadsorbaten an Oberflächen zu erhalten.

5.2.2 Immobilisierung von HRP auf einer Goldoberfläche [220]

5.2.2.1 Untersuchung der Anbindung von (Mercaptopropyl)trimethoxysilan

In diesem Kapitel sollen die Adsorption des (Mercaptopropyl)trimethoxysilan sowie die Hydrolyse- und Kondensationsreaktion der Silyletherbindung im MPTMS-Film auf der Goldoberfläche unter Verwendung von polarisationsmodulierten Infrarot-Spektroskopie (PM-IRRAS) untersucht werden. Für eine Adsorption von MPTMS auf der Goldoberfläche wurden die gereinigten Au/SiO₂-Wafer in die MPTMS-Methanol-Reaktionslösung überführt und inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die säurekatalysierte Hydrolyse- und Kondensationsreaktion der adsorbierten MPTMS-Moleküle auf dem Au/SiO₂-Wafer durchgeführt. Zur Untersuchung der Bildung des MPTMS-Films auf der Gold-Oberfläche wurden PM-IRRAS-Spektren dieser Goldoberfläche aufgenommen. Die adsorptionsbedingte Bildung des MPTMS-Films auf der Goldoberfläche lässt sich zuerst durch das Vorhandensein der symmetrischen Streckschwingungen der Methylgruppe vs (CH₃, FR = Fermi resonance) bei 2947 cm⁻¹ und vs (CH₃) bei 2844 cm⁻¹ im Reflexionsspektrum (Abbildung 5-24 c) bestätigen. Des Weiteren ist beim Vergleichen des puren MPTMS-Moleküls in der gelösten Form und des MPTMS-Films auf der Goldoberfläche auffallend, dass im Fingerprintbereich eine Frequenzverschiebung der symmetrischen Silyletherschwingung zu niederfrequenten Bereichen von 1075 cm⁻¹ auf 1113 cm⁻¹ erfolgt.

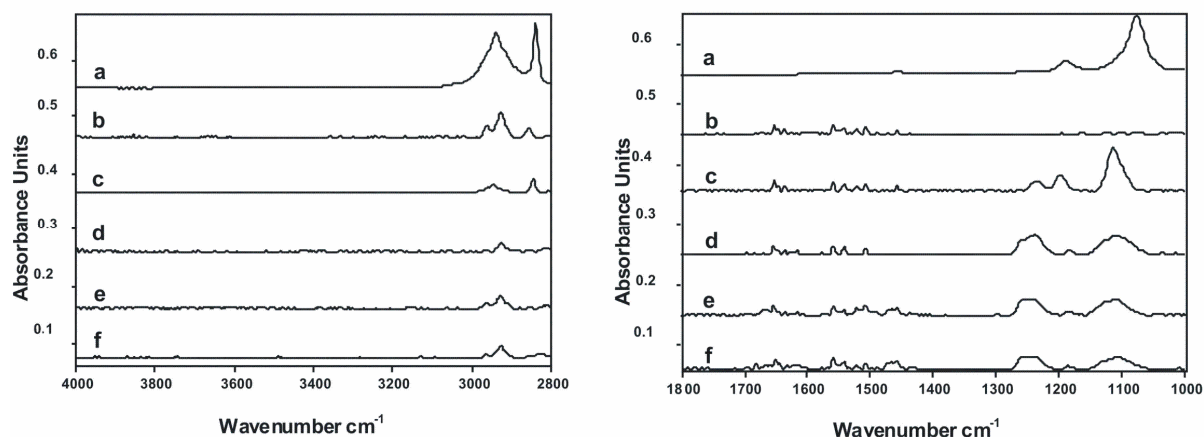


Abbildung 5-24: PM-IRRAS-Spektren in dem Wellenzahlbereich $4000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ und $1800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ von (a) purer MPTMS (Reinheit 95 %, ATR-IR-Spektrum), (b) gereinigtem Au/SiO₂-Wafer, (c) MPTMS-Film auf dem Au/SiO₂-Wafer, (d) MPTMS-Film nach 1 h Hydrolyse und Kondensation von 1 h, MPTMS-Film nach 2 h Hydrolyse und Kondensation, (f) MPTMS-Film nach 3 h Hydrolyse und Kondensation.

Weiterhin wurden zur Untersuchung der säurekatalysierten Hydrolyse- und Kondensationsreaktion Reflexionsspektren aufgenommen. Die Abbildung 5-24 d-f zeigt die Reflexionsspektren der Hydrolyse- und Kondensationsreaktion mit einer Behandlungszeit von 1 h, 2 h und 3 h in 0,1 M HCl bei 80 °C. Im IR-Spektrum (1d) fehlen die Absorptionsbanden bei 2947 cm^{-1} $\nu_s(\text{CH}_3, \text{FR})$ sowie bei 2844 cm^{-1} $\nu_s(\text{CH}_3)$ nach der Hydrolyse- und Kondensationsreaktion. Das Nichterscheinen dieser beiden Absorptionsbanden für die Methylstretschwingungen des Thiolsilans ist ein Indiz für die hydrolytische Spaltung der Si-OCH₃-Gruppe. Ein weiterer Hinweis für eine auf der Oberfläche ablaufende intermolekulare Vernetzung ist die Abflachung sowie die gleichzeitige Verbreiterung der Bande bei 1105 cm^{-1} , welche der Silylethergruppe charakteristisch zugeordnet wird. Als Nächstes werden die vier wichtigsten Banden des puren MPTMS-Moleküls bei 1259 cm^{-1} $\tau(\text{CH}_2, \text{Twist})$, 1238 cm^{-1} $\tau(\text{CH}_2, \text{Twist})$, 1189 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_3, \text{rk})$ und 1075 cm^{-1} $\nu_s(\text{SiO-C})$ untersucht (Abbildung 5-24). In diesem niederfrequenten Bereich ist die Bildung von MPTMS-Filmen auf dem Gold durch die Anwesenheit von $\tau(\text{CH}_2, \text{Torsion})$ bei 1236 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_3 \text{ rk})$ bei 1196 cm^{-1} und $\nu_s(\text{SiO-C})$ bei 1113 cm^{-1} zu erkennen (Abbildung 5-24 c). Nach der Hydrolyse und der Kondensation wurde durch das Eintauchen in 0,1 M HCl-Lösung für 1 h, 2 h und 3 h eine Abnahme der relativen Intensität der Absorptionsbande bei ca. 1196 cm^{-1} beobachtet, welche charakteristisch für die Methyldeformationsschwingung $\delta(\text{CH}_3, \text{rk})$ steht (Abbildung 5-24 d). Darüber hinaus wurde nach der Hydrolyse und Kondensation eine breite $\nu(\text{Si-O-Si})$ -Bande bei 1105 cm^{-1} beobachtet. An dieser Stelle ist anzumerken, dass es in der Regel schwierig ist, die Si-O-Si- von einer Si-O-C-Spezies mittels IR-Spektroskopie im Wellenzahlbereich von 1000 bis 1150 cm^{-1} gut zu

differenzieren, weil sich die beiden Absorptionsbanden in diesem Wellenlängenbereich überlagern. Über eine alternative Methode diese Spezies zu unterscheiden berichten Tian et al. [221] in Form der Erfassung von IR-Daten im longitudinalen optischen (LO) Photon-Modus. Dieser Modus ermöglicht es neu gebildete Si-O-Bindungen von dünnen SiO₂-Filmen auf der SAM/SiO₂/Si-Grenzfläche zu unterscheiden.

Als Ergebnis der Untersuchung der Anbindung von (Mercaptopropyl)trimethoxysilan mithilfe der PM-IRRA-Spektroskopie stellt man fest, dass eine intermolekulare Vernetzung durch eine wahrscheinliche Bildung von Siloxanbindungen, die für die weiteren Anbindungsschritte erforderlich sind, erfolgt.

5.2.2.2 Untersuchung der Anbindung von (Triethoxysilyl)undecanal

Um die vorhydrolysierte MPTMS-Schicht mit geeigneten funktionellen Gruppen zur spezifischen Immobilisierung der Proteine auszustatten, wurden im Anschluss an die Hydrolyse- und Kondensationsreaktion Aldehydgruppen an der Goldoberfläche eingeführt. Zu diesem Zweck erfolgte eine Anbindung des (Triethoxysilyl)undecanals (TESU) (Abbildung 5-25).

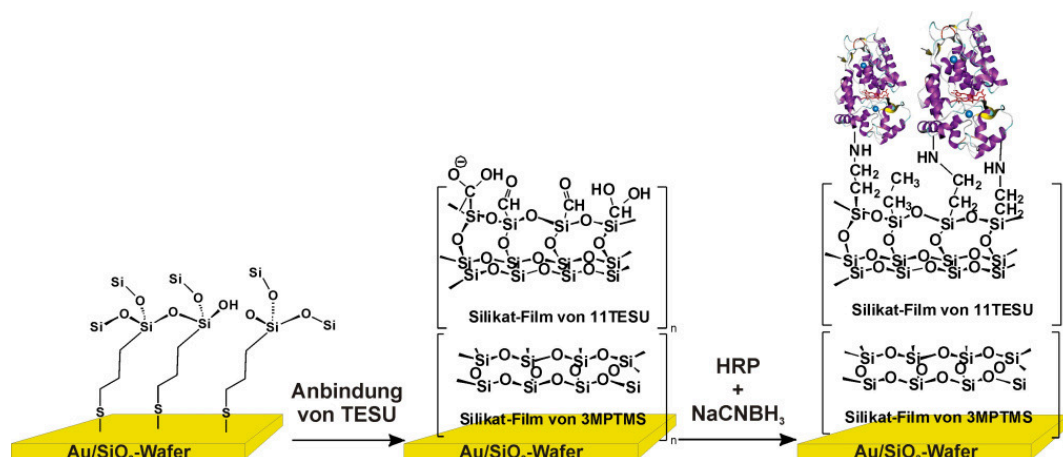


Abbildung 5-25: Darstellung der Anbindung des TESU auf dem hydrolysierten MPTMS-Film und Immobilisierung von HRP auf dem aldehydfunktionalisierten TESU-Film unter Ausbildung einer Imin-Gruppe durch reduktive Aminierung mit Natriumcyanoborhydrid.

Dazu wurden die mit MPTMS vorpräparierten Proben in die Reaktionslösung mit vorhydrolysierten TESU überführt, wobei in diesem Fall eine basenkatalysierte Hydrolyse unter Verwendung von Triethylamin abläuft [164]. Zur vollständigen Hydrolyse werden anschließend die mit TESU behandelten Proben einer Temperatur von 110 °C für 2 h im Ofen ausgesetzt.

TESU verfügt über eine Aldehydgruppe am organischen Ende des Trialkoxysilans, welche im letzten Schritt der spezifischen Immobilisierung der Proteine genutzt werden kann [71], [72],

[73]. Als ersten Hinweis für eine Anbindung des TESU auf Gold mit dem MPTMS-Film ist die Anwesenheit der asymmetrischen Streckschwingung $\nu_a(\text{CH}_2)$ bei 2982 cm^{-1} und der symmetrischen Streckschwingung $\nu_s(\text{CH}_2)$ bei ca. 2855 cm^{-1} (Abbildung 5-26 d) zu nennen. Das ATR-IR-Spektrum des reinen (Triethoxysilyl)undecanals zeigt eine Absorptionsbande bei 2974 cm^{-1} , welche der asymmetrischen Methylstreckschwingung des Aldehydsilans (Abbildung 5-26 a) zuzuordnen ist.

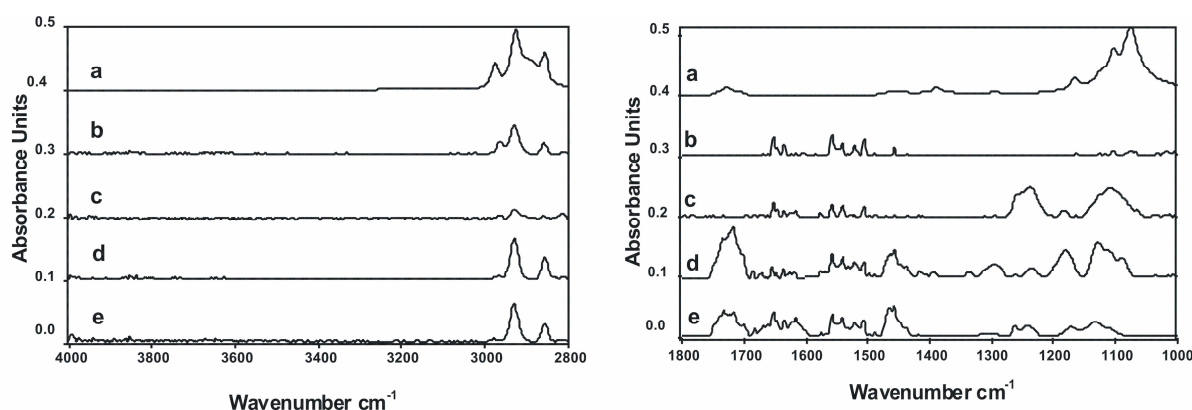


Abbildung 5-26: PM-IRRAS-Spektren im Wellenzahlbereich $4000 - 2000\text{ cm}^{-1}$ und $1800 - 1000\text{ cm}^{-1}$ purer TESU (ATR-IR-Spektrum) (a), (b) gereinigter Au/SiO₂-Wafer, (c) MPTMS-Film nach 1 h Hydrolyse und Kondensation auf dem Au/SiO₂-Wafer, (d) TESU und MPTMS-Filme auf dem Au/SiO₂-Wafer unter basischen Bedingungen (TEA), (e) nach 6 h Behandlung in 0,05 Carbonatpuffer (pH = 9,6).

Bei der Betrachtung der C=O-Streckschwingung der Aldehydgruppe des reinen TESU bei 1718 cm^{-1} ist auffällig, dass nach der Anbindung des aldehydfunktionalisierten Alkoxysilans auf der Goldoberfläche unter basischen Bedingungen die C=O-Streckschwingung in zwei Banden bei 1729 cm^{-1} und 1718 cm^{-1} aufgespalten wird (Abbildung 5-26 (a) oder (b)).

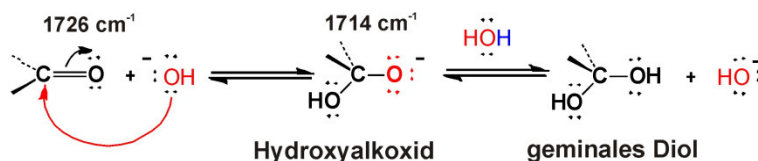


Abbildung 5-27: Schematische Darstellung der basischen Hydratisierung der Aldehydgruppe der TESU unter Ausbildung eines Hydroxyalkoxids auf der Silikat-Schicht [221].

In der Abbildung 5-27 werden zwei Peaks im Wellenzahlbereich von $1726 - 1714\text{ cm}^{-1}$ sichtbar. Diese Peaks deuten auf eine unvollständige Oxidation des TESU-Films unter Ausbildung eines Hydroxyalkoxids hin. Dieser Befund wird durch die Arbeit von R. Tian et al. [221] bestätigt, wobei die Auslagerung der TESU-SAMs in ihrer Arbeit auf SiO₂ im PBS-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 anstatt von Carbonatpuffer erfolgte.

Außerdem sind andere Absorptionsbanden sichtbar, wie der Peak bei 1458 cm^{-1} , der die CH_2 -Biegeschwingung charakterisiert, und eine Doppelstruktur (1443 cm^{-1} und 1458 cm^{-1}), welche der C-H-Schwingung der Aldehydgruppe zugeordnet werden.

Ferner lassen IR-Spektreninterpretationen den Schluss zu, dass eine weitere intermolekulare Vernetzung der TESU-Moleküle mit dem vorhydrolysierten MPTMS-Film auf Gold erfolgt.

Nach der Einführung der funktionellen Aldehydgruppen auf dem Au/ SiO_2 -Wafer durch den Silanisierungsvorgang mittels TESU wurden die spezifische Immobilisierung der Meerrettichperoxidase und die reduktive Aminierung unter Verwendung von Natriumcyanoborhydrid durchgeführt. Der Fokus bei dieser Untersuchung lag darauf die Einflüsse der spezifischen und unspezifischen Immobilisierung auf die Konformation der immobilisierten Proteine zu analysieren. Zur Untersuchung dieser Einflüsse wurde erneut die PM-IRRAS-Methode eingesetzt.

Diesbezüglich zeigt die aldehydfunktionalisierte Au/ SiO_2 -Oberfläche vor (a) und nach (b) der spezifischen Immobilisierung mit Meerrettichperoxidase.

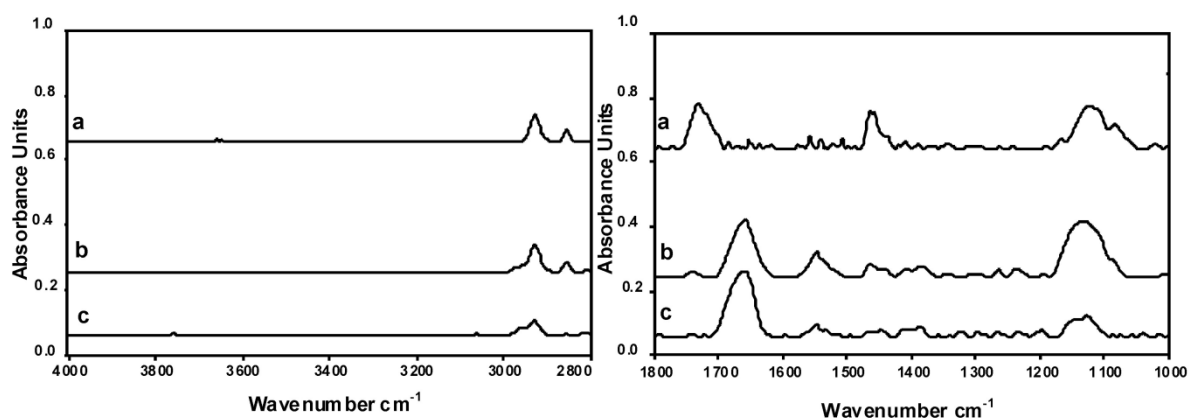


Abbildung 5-28: PM-IRRAS-Spektren in den Wellenzahlbereichen $4000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ und $1800 - 1000\text{ cm}^{-1}$ von TESU-Film mit den Aldehydgruppen auf dem Au/ SiO_2 -Wafer (a), TESU-Film mit Aldehydgruppen nach 6 h spezifischer Immobilisierung der HRP (b) und von Au/ SiO_2 -Wafer nach unspezifischer Adsorption der HRP (c).

Als Erstes fällt am PM-IRRAS-Spektrum (5-28-b) im Vergleich zum Spektrum (5-28-a) auf, dass die Intensität der $\nu(\text{C=O})$ -Schwingung bei ca. 1737 cm^{-1} signifikant abnimmt. Diese Intensitätsabnahme deutet auf eine nukleophile Reaktion zwischen Aldehydgruppen und α -Amin des Lysins mit seinem pK_s -Wert von 10,0 - 10,2 hin. Außerdem werden nach der Immobilisierung der HRP asymmetrische CH_2 -Streckschwingung bei 2928 cm^{-1} und die symmetrische CH_2 -Streckschwingung bei ca. 2855 cm^{-1} sowie $\nu(\text{Si-O-Si})$ bei ca. 1126 cm^{-1} und bei ca. 1087 cm^{-1} detektiert (Abbildung 5-28 b). Diese zeigen, dass die TESU-Silikat-Schicht erhalten bleibt. Ferner sind die Amid-I-Bande bei 1659 cm^{-1} und die Amid-II-Bande bei 1548 cm^{-1} des HRP auf der TESU-modifizierten Goldoberfläche zu sehen (Spektren b und c in der

Abbildung 5-28), welche in Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität des immobilisierten HRP im nächsten Unterkapitel ausführlich ausgewertet und anschließend ausdiskutiert werden.

Generell könnte der Verlauf der nukleophilen Reaktion auf der Basis der Imin-Bildung aufgrund drei reaktiver Positionen in der Aldehydgruppe das Carbonyl-Kohlenstoffatom und das Sauerstoffatom sowie das daran gebundene α -Kohlenstoffatom in Gegenwart von vielen Aminosäure-Seitengruppen des Proteins, die außer einer Iminbildung weitere Reaktionen durch nukleophilen oder elektrophilen Angriff starten können, stattfinden.

Außerdem sind die bei der spezifischen Immobilisierung eingestellten Lösungsparameter wie Ionenstärke, pH-Werte, Salze, Puffer, Temperatur nicht auf eine einzelne Aminosäure-Seitenkette des Lysins zu beziehen, sondern es müssen die restlichen Aminosäure-Seitengruppen berücksichtigt werden. Diese Berücksichtigung von zahlreichen Reaktionsmöglichkeiten der Aminosäure-Reste von biologischen Systemen aus chemischer Sicht macht schließlich die Selektivität der spezifischen Immobilisierungsmethoden zu einem nicht überschaubaren Reaktionstopf von vielen ablaufenden Reaktionen. Diesbezüglich existieren zahlreiche Arbeiten über die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Immobilisierung der Proteine auf der Basis der Ausbildung einer Imingruppe und ihrer reduktiven Aminierung. Wobei in mehreren Arbeiten Modellmoleküle wie Poly-L-Lysine [222] oder Polyethylenglykol- α,ω -bis(amine) [223] verwendet werden und bereits dadurch keine Übereinstimmung mit einer Immobilisierung der Proteine bieten. Eine solche Arbeit ist von Peelen et al. [224]. Jene beschäftigt sich mit der Herstellung von DNA-Arrays über eine reduktive Aminierungsreaktion zwischen endständigen Aldehydgruppen und aminomodifizierten Oligonukleotiden unter Verwendung von Natriumcyanoborhydrid. Die Oberflächenmodifikationen und Reaktionen wurden ebenfalls mithilfe der PM-IRRA-Spektroskopie untersucht. Hier wird berichtet, dass nach der Reaktion der primären Aminogruppe des Methylamins als Modellmolekül mit der aldehydfunktionalisierten Goldoberfläche unter Verwendung des Alkanthiols in wässrigem Puffer (10 mM HEPES, pH 8,5) eine Bildung der Imingruppe im IR-Spektrum bei 1678 cm^{-1} detektiert wird. In Anlehnung an die Arbeit von Horton et al., welche mittels IR-Spektroskopie über die Instabilität der Imingruppe aufgrund der Luftfeuchtigkeit berichtet, wurde dieses Problem durch die reduktive Aminierung zu einem sekundären Amin unter Verwendung des Reduktionsmittels NaCNBH_3 durchgeführt. Durch diese reduktive Aminierung erscheint eine neue Bande bei 1144 cm^{-1} , die der C-N-Streckschwingung zugeordnet wird. Daraufhin wird kein Rückstand des Imin-Peaks bei 1674 cm^{-1} beobachtet, was dafür spricht, dass die Iminbindung vollständig zu einem sekundären Amin reduziert wurde.

5.2.2.3 Untersuchung der katalytischen Aktivität der immobilisierten HRP

Beim Vergleich der enzymatischen Aktivität zwischen der spezifisch und der unspezifisch immobilisierten HRP ist festzustellen, dass die Extinktion (oder optische Dichte) des von der spezifisch immobilisierten HRP gebildeten gelben Farbstoffs 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenonchinon-4,4'-diimoniumions dreimal höher liegt als im Falle der HRP, welche unspezifisch auf der reinen Au/SiO₂-Wafer-Oberfläche immobilisiert wurde. Da die gemessene Extinktion nach dem *Lambert-Beerschen-Gesetz* proportional zur Konzentration ist, wird die Frage laut, ob dieser Farbintensitätsunterschied zwischen den beiden Immobilisierungsarten konzentrationsbedingt ist. In diesem Zusammenhang wird im Weiteren mithilfe des QCM-D-Verfahrens die immobilisierte Proteindichte bei beiden Immobilisierungsarten analysiert, um die Konzentrationsabhängigkeit bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der spezifischen und unspezifischen Immobilisierung auszuschließen.

Im Folgenden soll die Untersuchung der Konformation der HRP nach der unspezifischen und spezifischen Immobilisierung auf der Goldoberfläche im Vergleich zur Konformation in wässriger Lösung dargestellt werden, da die Proteinkonformation mit Aktivität der immobilisierten HRP korreliert.

Zur eindeutigen Identifizierung der bestimmten Sekundärstrukturanteile wurde zuerst das HRP-Enzym im trockenen Zustand mithilfe der ATR-IR-Spektroskopie unter Verwendung der Golden GateTM ATR-Einheit mit der robusten Anpressvorrichtung mit Saphirstempel und in wässriger Lösung (0,05 M Carbonatpuffer pH = 9,6) vermessen. Es wurde erwartet, dass aufgrund der Hydratation des Proteins Umorientierungen in den Sekundärstrukturanteilen stattfinden, die man anhand der Amid-Banden eindeutig zuordnen kann. Diesbezüglich zeigt die Abbildung 5-29 das IR-Spektrum der HRP in festem Zustand (5-29 (a)) im Vergleich zum IR-Spektrum der HRP im gelösten Zustand (5-29 (c) (0,05 M Carbonatpuffer)).

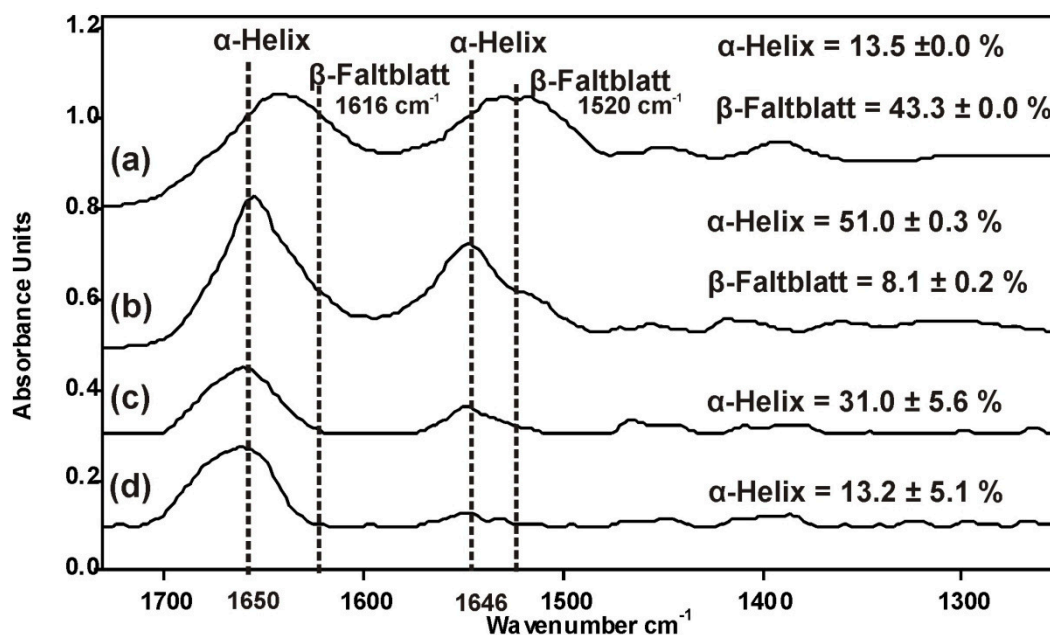


Abbildung 5-29: Darstellung der IR-Spektren von HRP in unterschiedlichen Zuständen. ATR-IR-Spektrum von HRP (a). Transmissionsspektrum von gelöster HRP in 0,05 M Carbonatpuffer (pH = 9,6) (b). PM-IRRAS-Spektren des TESU-Films mit Aldehydgruppen nach 6 h spezifischer Immobilisierung der HRP (c) und nach unspezifischer Immobilisierung auf dem Au/SiO₂-Wafer (d).

Es ist zunächst nicht sonderlich überraschend, dass das Protein in Kontakt mit Wasser aufgrund von Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen etc.) seine Struktur verändert. Aber bei dieser Messung können Unterschiede in den Amid-Bandenbereichen, welche bestimmte Sekundärstrukturanteile charakterisieren, herausgearbeitet werden und bei Diskussionen in Zusammenhang mit der Proteinkonformation auf Festkörperoberflächen herangezogen werden.

Bei der Betrachtung der Amid I- und Amid-II-Bande der gelösten HRP im Vergleich zur reinen festen HRP ist auffallend, dass das Absorptionsmaximum der Amid-I-Bande von 1649 cm⁻¹ (Abbildung 5-29) auf 1655 cm⁻¹ und das Absorptionsmaximum der Amid-II-Bande von ca. 1520 cm⁻¹ auf 1646 cm⁻¹ verschoben wird. Diese Amid-Bandenverschiebungen werden durch die Hydratation der gelösten Proteine verursacht. Unter Ausbildung der Hydrathüllen werden Wasserstoffbrückenbindungen in dem Protein aufgebaut, die wiederum das Gleichgewicht der Sekundärstrukturanteile beeinflussen. Da sich Wasserstoffbrückenbindungen in verschiedenen Sekundärstrukturanteilen in ihrer Art und Stärke unterscheiden, bestimmen diese auch die Lage, die Intensität und die Frequenz der Amid-I- und Amid-II-Bande. Diesbezüglich werden diese Bandenverschiebungen zum einen durch eine Zunahme des α-Helixanteils von 13,5 % auf 51 % und zum anderen durch eine gleichzeitige Abnahme des β-Faltblattanteils der gelösten HRP von 43,3 % auf 8,1 % im Vergleich zur festen HRP hervor-

gerufen. Trotz allem bleibt zunächst festzuhalten, dass die Absorptionsbande bei 1650 cm^{-1} spektroskopische Informationen über die helikale Struktur der HRP auf der Oberfläche liefert. Beim Vergleichen des IR-Spektrums der gelösten HRP (Abbildung 5-29 (b)) mit dem IR-Spektrum der spezifisch immobilisierten (Abbildung 5-29 (c)) sowie unspezifisch immobilisierten HRP auf der Goldoberfläche (Abbildung 5-29 (d)) ist festzustellen, dass die Amid-II-Bande aufgrund der starken Intensitätsabnahme bei 1520 cm^{-1} außerhalb des kalibrierten Bereiches liegt und dadurch eine Vorhersage des β -Faltblattanteils unmöglich macht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Konformationsänderung der immobilisierten HRP im Vergleich zu der gelösten HRP durch die Intensitätsabnahme und die Form der Amid-I- und Amid-II-Banden eindeutig zu erkennen ist. Wobei man anmerken muss, dass die betrachtete immobilisierte Proteinkonzentration im Gegensatz zu den gelösten Proteinen an der Festkörperoberfläche nicht bekannt ist. Nichtsdestotrotz können die spezifische und die unspezifische Immobilisierung der HRP mit der Annahme, dass bei beiden Immobilisierungsarten die Belegungsdichte des Proteins gleich ist, im Hinblick auf die Proteinstruktur verglichen werden.

Die Form der Amid-I-Bande der spezifisch immobilisierter HRP und der unspezifisch-immobilisierten HRP auf der Goldoberfläche ist ähnlich. In der IR-Spektroskopie wird die Amid-I-Bande bei $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ zu 80 % Anteil durch die Carbonylstreckschwingung der Peptidbindung hervorgerufen (Abbildung 5-30).

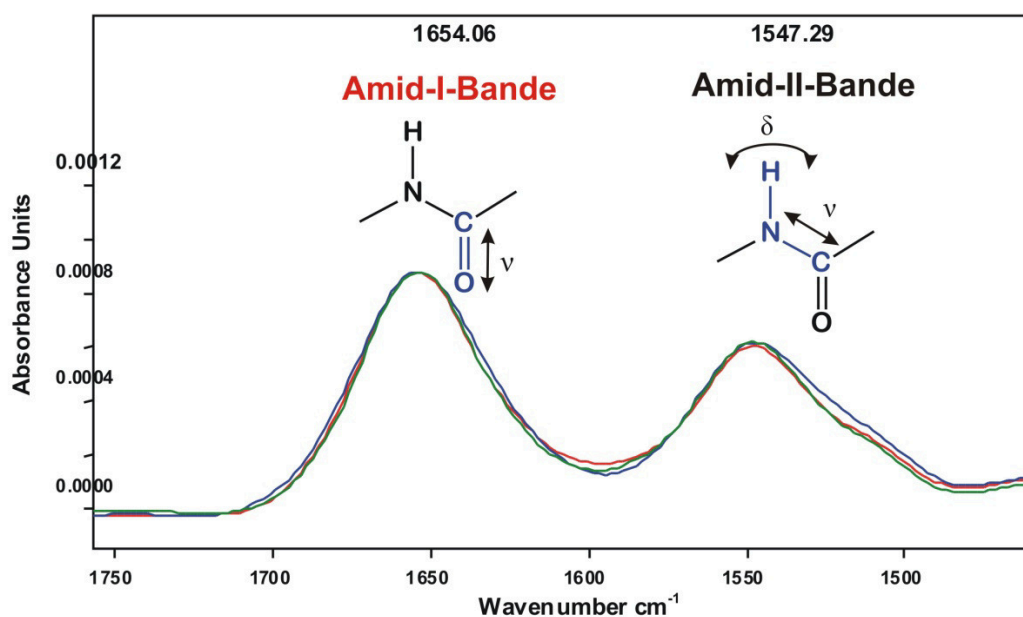


Abbildung 5-30: Amid-Banden der drei Messungen 5 mg HRP/10 mL 0,05 M Carbonatpuffer, pH = 9,6.

Weiterhin ist auffallend, dass die Bandenintensität und -breite der Amid-I-Bande spezifisch immobilisierter HRP im Vergleich zu unspezifisch immobilisierter HRP ähnlich ist. Hierbei ist anzunehmen, dass das Dipolmoment bei der Anregung der Carbonylstreckschwingung beider Immobilisierungsarten gleich ist. In der Regel lässt sich das Dipolmoment der Carbonylstreckschwingung im Protein durch intramolekulare sowie intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen mit Intensitäts- und Frequenzveränderungen beeinflussen. Eine mögliche Erklärung für die Bandenintensität ist, dass es sich bei beiden Proben um den gleichen Wassergehalt handelt, was dazu führt, dass die Art und Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen und somit Übergangsdipolmoment bei Carbonylschwingung bei beiden Immobilisierungsarten gleich ist.

Allerdings würde man den unterschiedlichen Wasseranteil der Proben an einer veränderten IR-Absorption zwischen 3000 cm^{-1} und 3600 cm^{-1} in der Abbildung 5-28 erkennen, da sich in diesem Wellenzahlenbereich die Valenzschwingung des Wassers und die N-H-Schwingung bei $3320 - 3270\text{ cm}^{-1}$ von Proteinen unterscheiden lassen. Den Spektren (b) und (c) in der Abbildung 5-28 zufolge sind keinenennenswerten Unterschiede im Wellenzahlenbereich $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$ vorhanden. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf den gleichen Wassergehalt in den jeweiligen adsorbierten Proteinfilmen zurückzuführen. Allerdings fällt beim Betrachten der Amid-II-Bande in den PM-IRRAS-Spektren (b) und (c) (Abbildung 5-28) auf, dass die Amid-II-Bande der unspezifisch immobilisierten HRP (c) viel weniger intensiv als im Spektrum (b), bei der spezifisch immobilisierten HRP ist. Daraus folgt, dass die elektromagnetische Anregung der N-H-Deformationsschwingung und der C-N-Streckschwingung der Peptidbindung der unspezifisch immobilisierten HRP im Vergleich zu der spezifisch immobilisierten HRP unterschiedlich ist, was sich in den Banden widerspiegelt.

Die Amid II-Bande bei 1540 cm^{-1} bis 1615 cm^{-1} , die zu 40 bis 60 % N-H-Biegeschwingung und zu 18 bis 40 % C-N-Streckschwingung sowie zu ca. 10 % C-C-Streckschwingung in sich vereint [130], deutet auf eine stärkere Veränderung in der Proteinkonformation der auf der reinen hydrophilen Goldoberfläche unspezifisch immobilisierten HRP im Vergleich zur spezifisch immobilisierten HRP hin. Diesbezüglich würde man bei Proteinspektren mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad laut der Proteinstruktur-Funktions-Beziehung verschiedene Aktivitäten erwarten. Um die Aktivität der immobilisierten HRP zu analysieren, wurde das farblose Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Enzymassay verwendet, welches von der Meerrettichperoxidase in ein blaues 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation als Ladungs-Transfer-Komplex umgewandelt wird. Anschließend wird dieser Radikalkation-Komplex über die enzymatische Oxidation durch die Zugabe von 2M H_2SO_4 in ein

gelbgefärbtes 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenonchinon-4,4'-diimoniumion als Endprodukt umgewandelt. Durch die Absenkung des pH-Wertes wurde die peroxidische Aktivität gestoppt und zugleich die Farbe des gebildeten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenonchinon-4,4'-diimoniumions stabilisiert. Nachfolgend wurde die Extinktion des stabilisierten Diimins bei $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ mithilfe eines Mikroplatten-Lesegerätes vermessen, um eine Aussage über die Aktivität der unspezifisch und spezifisch immobilisierten Meerrettichperoxidase zu treffen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Abbildung 5-31 zusammenfassend dargestellt.

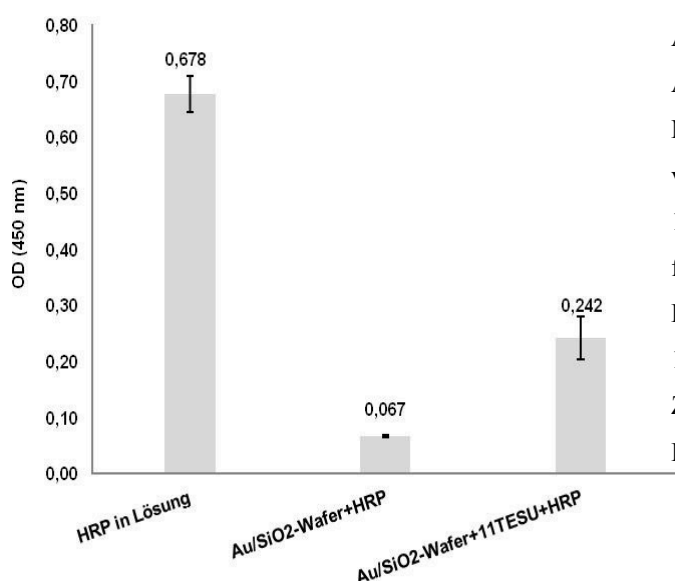


Abbildung 5-31: Vergleich der katalytischen Aktivität der HRP in Lösung (5 mg/10 mL 0,05 M Carbonatpuffer, pH = 9,6) mit der kat. Aktivität der HRP auf der Au/SiO₂- und auf der 11TESU-modifizierten Au/SiO₂-Wafer-Oberfläche. Inkubation in TMB-ELISA 25 µL auf Proben-Oberfläche unter Raumbedingungen 15 min (blaugefärbtes Produkt). Anschließend Zugabe von 25 µL 2M H₂SO₄ (gelbgefärbtes Endprodukt).

In der Abbildung 5-31 ist auffallend, dass die Extinktion des von der spezifisch immobilisierten HRP gebildeten gelben Farbstoffs 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-di-phenonchinon-4,4'-diimoniumions dreimal höher liegt als im Falle der HRP, welche unspezifisch auf der reinen Au/SiO₂-Wafer-Oberfläche immobilisiert wurde.

Generell ist aus der Literatur bekannt, dass die Proteinkonzentration in Lösung einen Effekt auf die adsorbierte Proteinmenge hat [225]. In der Regel wird während einer Proteinadsorption an Festkörperoberflächen ein gesättigter Zustand bei hohen Proteinkonzentrationen in einer kürzeren Zeit erreicht als bei niedrigen Proteinkonzentrationen. Die Folge davon ist, dass im Falle einer hohen Proteinkonzentration in Lösung eine höhere Adsorptionsdichte des Proteins an Festkörperoberflächen als bei niedrigeren Proteinkonzentration vorliegt. In diesem Zusammenhang zeigt die Abbildung 5-32 aus der Adsorptionsstudie von Marijn van der Veen et al. [225] die Adsorptionskurven des α -Lactalbumins bei einem pH-Wert von 4 bei verschiedenen Proteinkonzentrationen in der Lösung (Abbildung 5-32 (A)) sowie Proteinadsorption auf zwei verschiedenen Festkörperoberflächen. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Zuführungsrate mit der Proteinkonzentration steigt, was dazu führt, dass die Adsorptionsdich-

te mit der steigenden Konzentration erhöht wird. Aus diesem Grund unterscheidet sich die Massenkonzentration in Lösung von der Massenkonzentration der adsorbierten Proteine an Festkörperoberflächen.

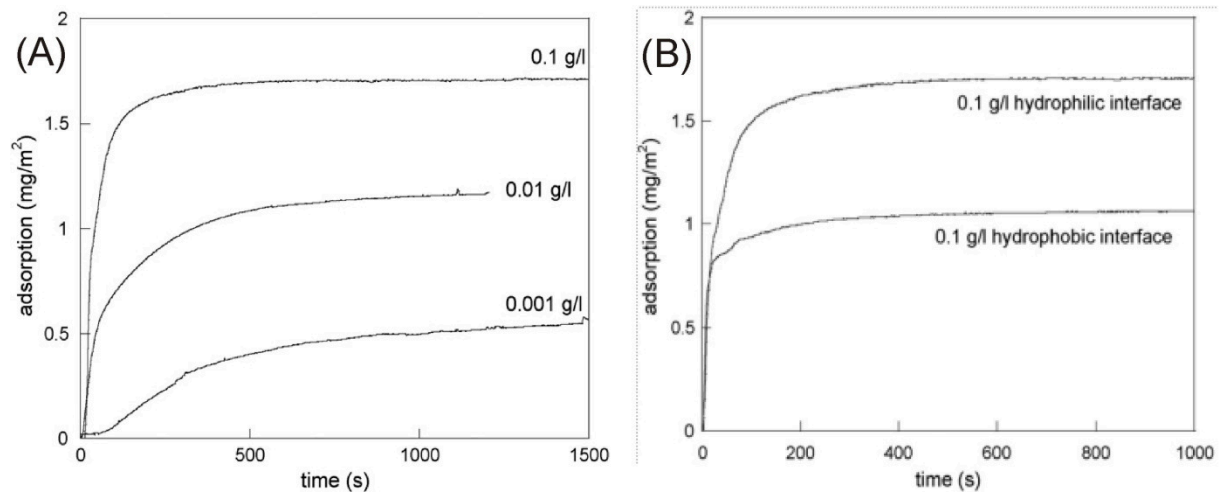


Abbildung 5-32: Adsorption von α -Lactalbumin auf der SiO_2 -Oberfläche bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (A), Adsorption von 0,1 g/L α -Lactalbumin auf hydrophilen und hydrophoben SiO_2 -Oberflächen (B) [225].

Weiterhin zeigt die Abbildung 5-32 (B), dass die Adsorptionsisotherme Γ (mg/m^2) bei einer Adsorption des α -Lactalbumins aus der Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,1 g/L auf der hydrophilen Oberfläche höher liegt als im Falle der hydrophoben SiO_2 -Oberfläche [225]. In diesem Zusammenhang lässt sich aus diesen Ergebnissen eine Schlussfolgerung im Hinblick auf die spezifische und unspezifische Immobilisierung ziehen. Dass nämlich der oben beschriebene Farbintensitätsunterschied bei den beiden Immobilisierungsarten mit einer quantitativen Differenz in der adsorbierten Proteindichte zu erklären ist. Im Weiteren wird mithilfe des QCM-D-Verfahrens die immobilisierte Proteindichte der beiden Immobilisierungsarten analysiert, um eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der spezifischen und unspezifischen Immobilisierung auszuschließen.

5.2.2.4 Auswertung der QCM-D-Experimente

In diesem Kapitel sollen die adsorbierten Proteinmassen pro Flächeneinheit mittels Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsmessung (QCM-D, engl. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation) bestimmt werden.

Die verwendeten QCM-D-Quarzkristalle wurden unter Verwendung der Organosilane TESU und MPTMS funktionalisiert. Die QCM-D-Quarzkristall-Oberfläche weist einen Wasserkontaktwinkel von ca. 90° im Vergleich zum reinen QCM-D-Quarzkristall mit einem Wasserkontaktwinkel von 15° auf.

In der Tabelle 28 sind die ausgewerteten QCM-D-Daten einer spezifischen und einer unspezifischen Immobilisierung zusammengefasst.

Tabelle 28: QCM-D-Daten für die Adsorption von HRP auf einer hydrophoben mit TESU-modifizierten Au-Quarzkristall-Oberfläche (spezifische Immobilisierung) und auf einer homogenen hydrophilen Au-Quarzkristall-Oberfläche (Aufnahme der Daten nach 1,5 h Spülvorgang unter Verwendung des 0,05 M Carbonatpuffer mit einem Volumenstrom von 150 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Substrat-Oberfläche	Δf [Hz]	Δm [ng/cm^2]	ΔD [10^{-6}]	$\Delta D/\Delta f$ [10^{-8}]
TESU + MPTMS + Au-Quarzkristall	-34,03	599,99	2,50	-7,35
Au-Quarzkristall	-24,67	432,74	0,32	-1,30

Anschließend soll die Information über strukturelle Veränderungen der unspezifisch und spezifisch immobilisierten HRP mittels PM-IRRAS gewonnen werden. Zum einen wird hier das Adsorptionsverhalten der Meerrettichperoxidase mittels QCM-D-Methode in 0,05 M Carbonatpuffer (pH = 9,6) auf einer aldehydfunktionalisierten hydrophoben Au-Quarzkristall-Oberfläche, zum anderen auf einer homogenen hydrophilen Au-Quarzkristall-Oberfläche untersucht. Am Anfang wurden die Quarzkristalle mit Carbonatpuffer für 19 min gespült (Abbildung 5-33 (A)) Danach wurde die HRP-Carbonat-Lösung weitere 143 min über die Quarzkristalle geleitet. Anschließend wurde nach 2h 7 min der Spülvorgang mit dem Carbonatpuffer für eine Dauer von 1h 30 min eingeleitet. Während der Adsorption strömte die Enzymlösung parallel zur Quarz-Oberfläche. Diese Strömungsart wird auch als laminare Strömung bezeichnet.

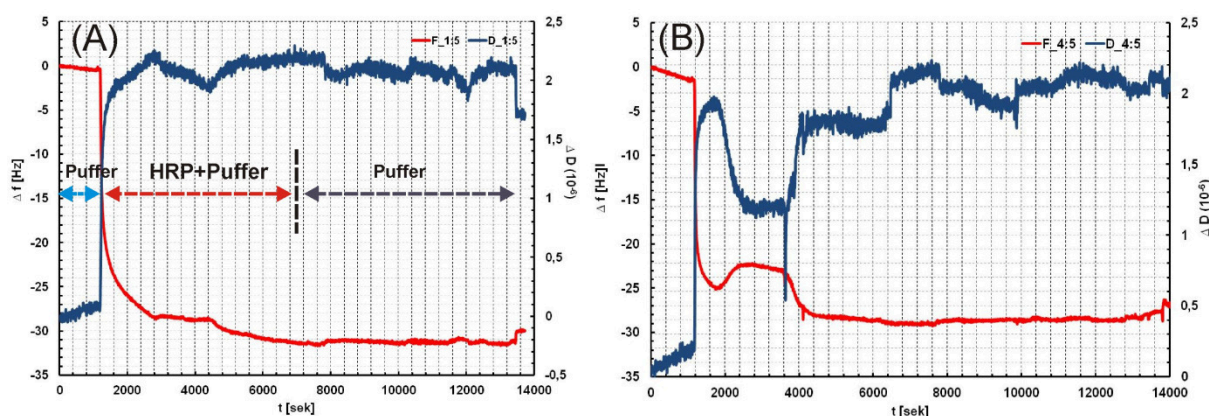


Abbildung 5-33: Spezifische Adsorption von HRP auf dem aldehydfunktionalisierten Au-Quarzkristall (A) und unspezifische Adsorption auf der Goldoberfläche in 0,05 Carbonatpuffer (B). Dargestellt sind die Frequenz- (Δf rot) und Dissipationsänderungen (ΔD blau) des fünften Obertons.

Im Allgemeinen erlaubt die QDM-D-Methode nicht nur eine Feststellung der Unterschiede der Adsorptionsvorgänge sowie eine Gewinnung quantitativer Informationen über die Adsorbate, sondern ermöglicht es auch Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften der adsorbierten Spezies auf den Quarzkristall-Oberflächen zu gewinnen. In Abbildung 5-34 wird gezeigt, wie das Dissipationssignal von der Steifigkeit/Elastizität des adsorbierten Films abhängt. Bei steifen Adsorbaten liegt das Dissipationssignal höher als bei weichen Adsorbaten.

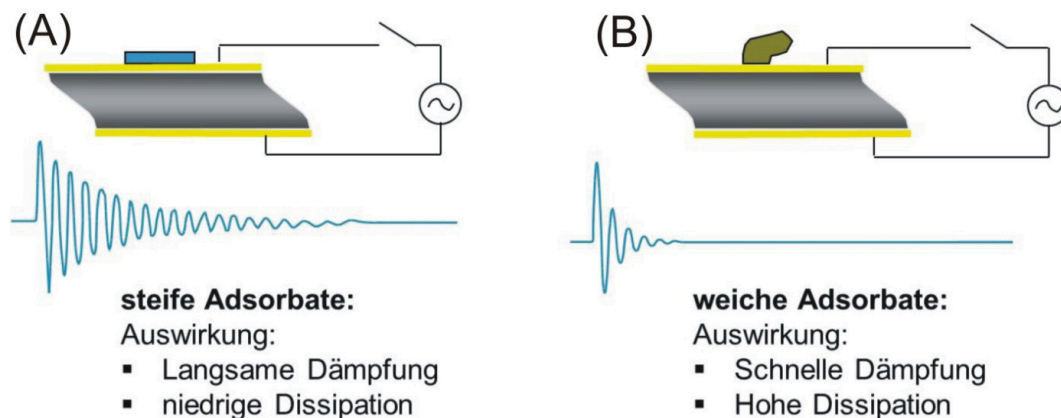


Abbildung 5-34: Schematische Darstellung eines QCM-D-Signals für steife (A) und weiche (B) Adsorbate. Nach Ausschalten der Spannung kann das Dissipationssignal aufweisen. Der Dissipationsvorgang kann bis zu 200-mal pro Sekunde erfolgen. (Dies führt bei der QCM-D-Methode zu einer hervorragenden Sensitivität) (abgewandelt von [226]).

In diesem Zusammenhang sollen zunächst die Dissipationsänderungen betrachtet werden (Abbildung 5-33). Auffallend ist, dass die Verläufe der Dissipationsänderungen bei spezifischen und unspezifischen Adsorption der Meerrettichperoxidase auf dem Quarzkristall unterschiedlich sind. Der Unterschied spiegelt sich auf dem aldehydfunktionalisierten Quarzkristall in einer schnellen Dämpfung des Dissipationssignals im Vergleich zur unspezifischdirekten Adsorption auf dem unmodifizierten Quarzkristall wieder, wo das Dissipationssignal langsam gedämpft wird. Mit einer Zahl ausgedrückt, beträgt der Unterschied in der Dissipationsänderung etwa 2,18 Einheiten auf dem aldehydfunktionalisierten QCM-D-Quarzkristall im Vergleich zur unspezifischen Adsorption. Dies deutet darauf hin, dass die adsorbierten HRP-Moleküle, die auf dem silikatisierten Film des Quarzkristalls adsorbieren, weicher als direkt auf dem Quarzkristall adsorbierte HRP-Schicht erscheinen. Eine mögliche Erklärung dafür im Falle der spezifischen Immobilisierung ist, dass in der Silikatschicht auf dem Quarzkristall mehr Wasser eingeschlossen wird als bei einer unspezifischen Adsorption, bei der nur die adsorbierten Enzym-Filme Wassermoleküle enthalten. Weiterhin ist in der Abbildung 5-33

auffallend, dass sich die Frequenzänderung während des Spülvorgangs mit dem Arbeitspuffer, welcher nach 2 h Injektion der HRP-Pufferlösung einsetzt, im Fall spezifischer wie unspezifischer Immobilisierung wenig verändert. Diese Tatsache spricht für eine permanente Bindung. Als Nächstes wird die zeitliche Änderung der adsorbierten Masse pro Flächeneinheit während der Adsorption des HRP-Enzyms in der Abbildung 5-35 betrachtet. Zunächst fällt auf, dass die unspezifische Adsorption im Vergleich zur spezifischen Adsorption der HRP schneller verläuft.

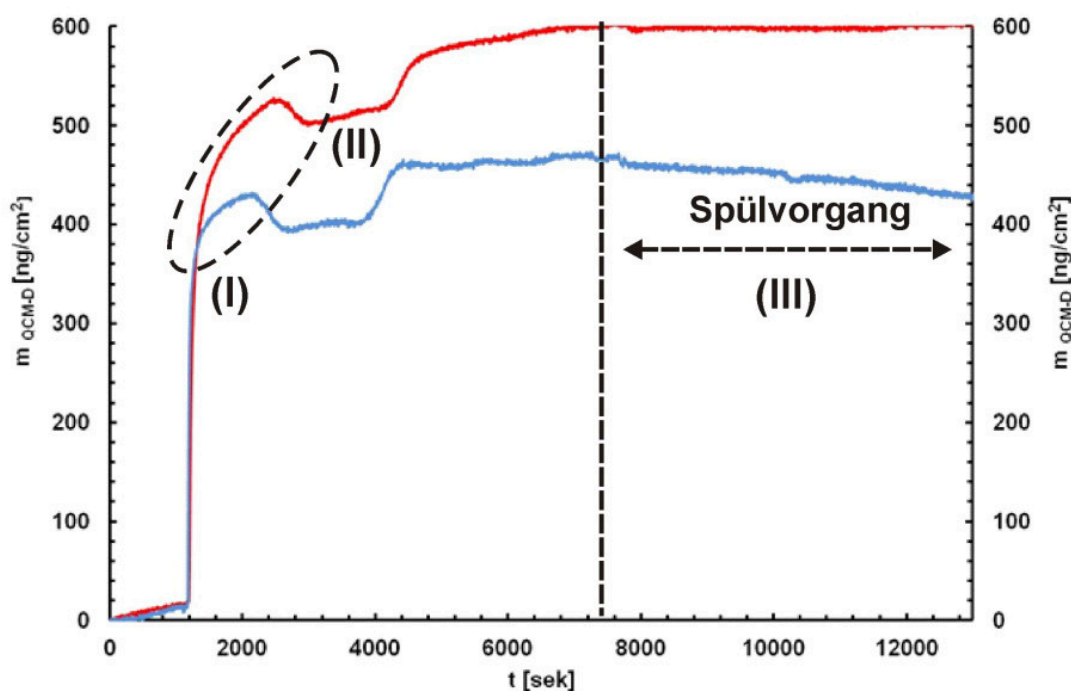


Abbildung 5-35: Zeitlicher Verlauf der QCM-D-Massenänderung für HRP-Moleküle in Carbonatpuffer während der spezifischen Immobilisierung auf dem Silikatfilm aus Aldehydgruppen (rote Kurve) und der unspezifischen Immobilisierung auf der homogenen QCM-D-Oberfläche (blaue Kurve).

Nach der Adsorptionszeit von 2 h ist die adsorbierte HRP-Masse von 600 ng/cm^2 bei der spezifischen Immobilisierung höher als bei der unspezifischen Immobilisierung mit einer adsorbierten Masse von 470 ng/cm^2 . Nach der Adsorptionssättigung wird der Waschvorgang mit dem Arbeitspuffer eingeleitet. Im Vergleich zur unspezifischen Adsorption findet keine Änderung des Adsorbates statt. Dies bedeutet, dass die spezifisch adsorbierten HRP-Moleküle im Vergleich zu unspezifisch adsorbierten HRP-Enzymen unter vorgegebenen Umgebungsparametern wie Strömungsgeschwindigkeit, Proteinkonzentration der einleitenden Arbeitsproteinlösung sowie pH-Wert der Arbeitslösung irreversibel verläuft.

Eine mögliche Erklärung für die höhere adsorbierte Menge im Falle der spezifischen Immobilisierung ist die Fläche, die mit den Silikatschichten einen rauerer Untergrund und damit eine größere spezifische Fläche im Vergleich zum reinen QCM-D-Quarzkrystall mit einer

Oberflächenrauigkeit von $0,97 \pm 0,08$ nm besitzt. Eine weitere Erklärung für die erhöhte Adsorption von HRP in dem Fall der spezifischen Immobilisierung kann unter dem Gesichtspunkt der Funktionalität der verwendeten Oberflächen erfolgen.

Um Auswirkungen der Hydrophobie der Silikatschicht im Falle der spezifischen Immobilisierung und der Hydrophile der Goldoberfläche im Falle der unspezifischen Immobilisierung auf die Konformation der adsorbierten HRP-Filme im Nanometerbereich auf den QCM-D-Quarzkristallen zu untersuchen, wurde die oberflächensensitive PM-IRRAS-Methode herangezogen. So wurden von den adsorbierten HRP-Filmen auf QCM-D-Quarzkristallen IR-Spektren aufgenommen. In der Abbildung 5-36 werden originale PM-IRRAS-Reflektivitätsspektren von einem gereinigten QCM-D-Quarzkristall sowie von spezifisch adsorbierten HRP-Enzymen auf dem QCM-D-Quarzkristall mit einer aldehydfunktionalisierten Silikatschicht sowie von den unspezifisch adsorbierten HRP-Enzymen auf dem homogenen QCM-D-Quarzkristall gezeigt. Die Messung wurde bei einem Einfallswinkel von $83,5^\circ$ mit p- und s-polarisiertem Infrarotlicht durchgeführt. Im IR-Reflektivitätsspektrum eines gereinigten QCM-D-Quarzkristalls sind zwei Absorptionsbanden erkennbar, eine davon wird der Si-O-Si-Streckschwingung bei 1114 cm^{-1} zugeordnet und stimmt mit den Literaturdaten überein [227]. Die Absorptionsbande bei 1359 cm^{-1} stellt die SO_x -Schwingungen dar [228]. Beim Vergleich der Reflektionsspektren zwischen spezifisch und unspezifisch adsorbierten HRP-Enzymen ist auffällig, dass die Intensität der Amid-II-Bande des unspezifisch adsorbierten HRP-Enzyms im Gegensatz zu spezifisch adsorbierten HRP-Enzymen viel geringer ist. Dieser Befund wurde bereits in Abschnitt 5.2.2.2 (Abbildung 5-28) festgestellt und gilt somit als zusätzliche Bestätigung für die Richtigkeit des Ergebnisse. Dieses experimentelle Resultat zeigt größere strukturelle Veränderungen der HRP im Falle der direkten unspezifischen Adsorption an der Goldoberfläche im Vergleich zu einer spezifischen Adsorption auf dem QCM-D-Quarzkristall mit einer aldehydfunktionalisierten Silikatschicht.

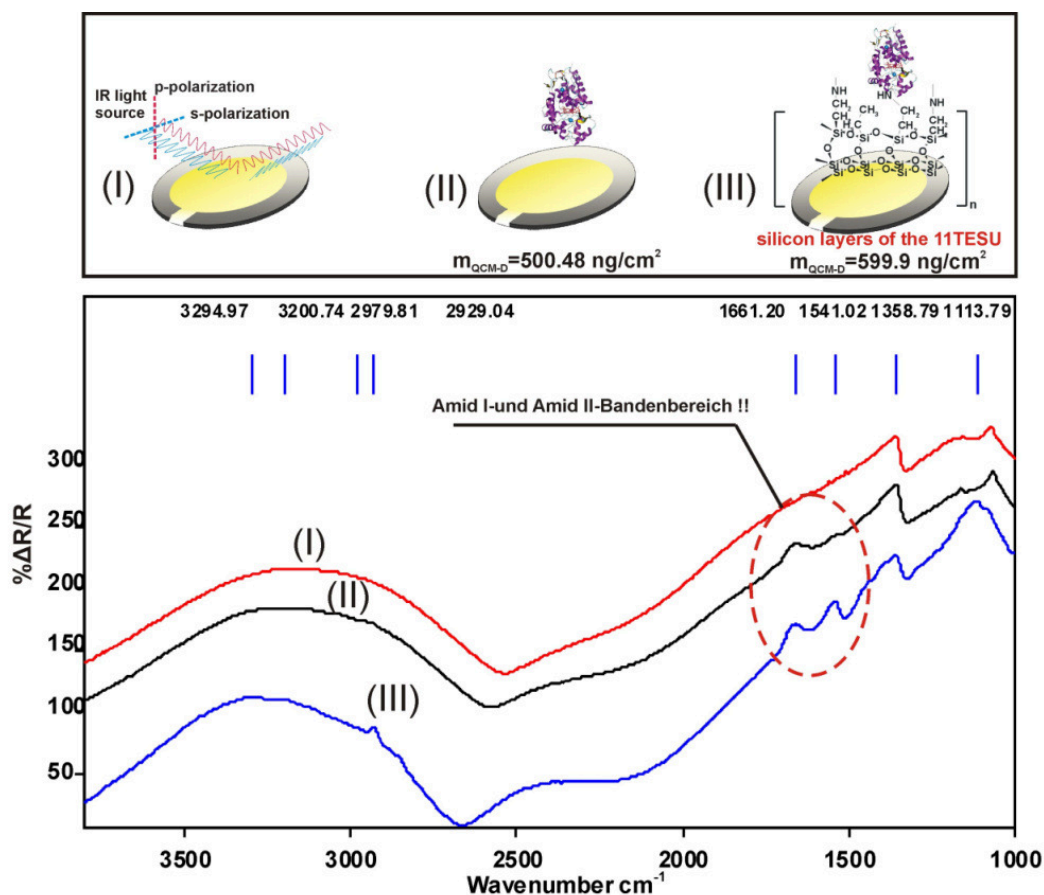


Abbildung 5-36: PM-IRRAS-Reflektivitätsspektren eines reinen QCM-D-Quarzkrystals (I), unspezifisch adsorbierten HRP-Enzymen auf dem QCM-D-Quarzkrystal (II) und spezifisch adsorbierten HRP-Enzyms auf dem QCM-D-Quarzkrystal mit aldehydfunktionalisierter Silikatschicht.

Eine mögliche Erklärung für eine stärkere Dekonformation der unspezifisch adsorbierten HRP auf der hydrophilen Goldoberfläche wäre eine ausgeprägte Affinität der Aminosäure-Seitenketten zu Gold. Diesbezüglich wurde eine Simulationsstudie von Hoeffling et al. [229] durchgeführt. In dieser Studie wird gezeigt, dass aromatische < schwefelhaltige < positiv geladene < polare < aliphatische und schließlich negativ geladene Aminosäure-Reste eine Affinität zu Gold aufweisen. Diese Studie bekräftigt hiermit die Vermutung über eine mögliche Ursache der starken Konformationsänderung der unspezifisch adsorbierten HRP auf der Goldoberfläche.

Um eine mögliche Korrelation zwischen der oberflächeninduzierten Denaturierung und enzymatischer Aktivität zu überprüfen, wurden die Aktivitätstests unter Verwendung des farblosen Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Vergleich der katalytischen Aktivität der spezifisch und der unspezifisch adsorbierten HRP-Moleküle auf QCM-D-Quarzkristall-Oberflächen. Protokoll: Inkubation in TMB-ELISA 40 µL auf Proben-Oberfläche unter Raumbedingungen 15 min (blaugefärbtes Produkt). Anschließend Zugabe von 40 µL 2M H₂SO₄ (gelbgefärbtes Endprodukt).

Probe	Absorption bei 450 nm (*)
Au-QCM-D-Quarzkristall ohne HRP (negativ Kontrolle)	0,038
	0,037
HRP + TESU + MPTMS + Au-QCM-D-Quarzkristall	0,062
(spezifisch bedingte Immobilisierung)	0,051
HRP + Au-QCM-D-Quarzkristall (unspezifisch bedingte	0,062
Immobilisierung)	0,052
(*) Messgenauigkeit laut Hersteller < 2 %.	

Die Aktivitätstests zeigen eindeutig, dass Meerrettichperoxidase nach einer Immobilisierung an eine Oberfläche ihre biologische Aktivität aufrecht beibehält und dass sich die enzymatischen Aktivitäten der spezifisch und unspezifisch adsorbierten HRP nicht voneinander unterscheiden. In diesem Zusammenhang berichten K. P. Fears et al. [4] über eine Korrelation zwischen der Proteingröße und der Erhaltung der Bioaktivität der adsorbierten Enzymen an Festkörperoberflächen. Das Ergebnis dieser Studie ist, dass große Proteine mit einem aktiven Zentrum, welches sich, im Gegensatz zu kleineren Enzymen, in einer „tiefen Tasche“ befindet, trotz einer starken, durch die Adsorption an Festkörperoberflächen induzierten, Sekundärstrukturveränderung ihre Bioaktivität beibehalten oder sogar verbessern [4].

Mit den Erkenntnissen dieser Studie und vor dem Hintergrund der (PM-IRRAS) Analyse ist anzunehmen, dass die katalytische Aktivität des aktiven Zentrums der HRP aus Eisen-Protoporphyrin IX im Falle der spezifischen als auch im Falle der unspezifischen Immobilisierung von den starken strukturellen Konformationsänderung unbeeinflusst bleibt. Weil das aktive Zentrum trotz der durch die Protein-Festkörper-Wechselwirkungen induzierter Konformationsänderung der Peroxidase weiterhin für das Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin während der Bestimmung der Aktivität frei zugänglich ist. Und somit zur selben Peroxidase-Aktivität in beiden Fällen der Immobilisierung, spezifisch als auch unspezifisch, führt. Um eine eindeutige Schlussfolgerung der Protein-Festkörperoberflächen -Wechselwirkungen im Hinblick auf die Aktivität zu treffen, muss nicht nur die dynamische Konformationsänderung der Proteine sondern sondern auch die Konstitution der Aminosäuren sowie die nicht-kovalente Wechselwirkungen um den aktiven Zentrum analytisch betrachtet werden.

5.2.3 Immobilisierung des AFP Typ III auf der Goldoberfläche

Die Immobilisierung des AFP Typ III auf der Goldoberfläche erfolgte nach der bereits erarbeiteten Immobilisierungsstrategie, welche schematisch in der Abbildung 2-14 dargestellt ist. Sie wird in vier Syntheseschritte unterteilt, von der Anbindung des thiolbasierten Trialkoxysilans (Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPTMS) bis zur anschließenden Aufbringung des aldehydbasierten Trialkoxysilans (Triethoxysilyl)undecanals. Da die Auswertungen dieser Immobilisierungsschritte bereits in den Abschnitten 5.2.2.1 und 5.2.2.2 beschrieben wurden, wird in diesem Unterkapitel nur auf die strukturelle Veränderung zwischen spezifischer und unspezifischer Immobilisierung mithilfe der PM-IRRAS-Spektroskopie eingegangen. Zu diesem Zweck werden in der Abbildung 5-37 die Reflexions-Absorptionsspektren des AFP Typ III-Proteins nach einer spezifischen Immobilisierung an die aldehydfunktionalisierte Goldoberfläche und nach einer unspezifischen Immobilisierung an die Goldoberfläche gezeigt.

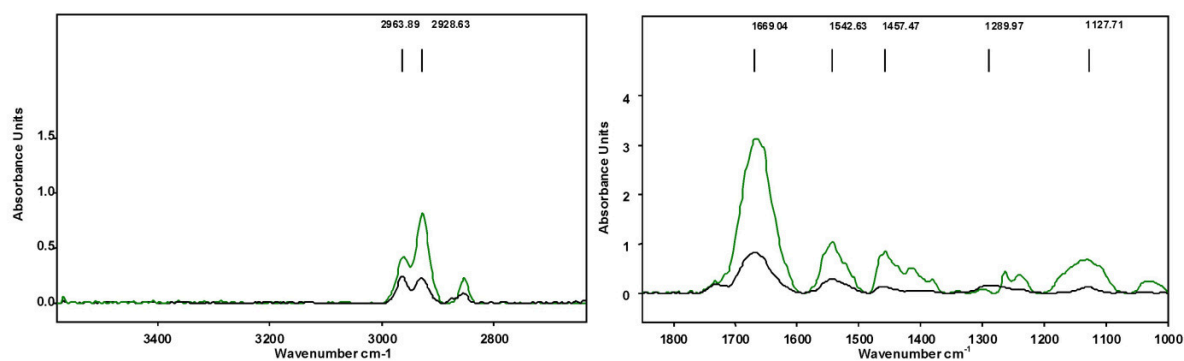


Abbildung 5-37: PM-IRRAS-Spektren in den Wellenzahlbereichen $3600 - 2600 \text{ cm}^{-1}$ und $1850 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ eines TESU-Films mit Aldehydgruppen nach 6 h spezifischer Immobilisierung des AFP Typ III (Spektrum in grün) und nach unspezifischer Immobilisierung auf einem Au/SiO₂-Wafer (Spektrum in schwarz).

Als Erstes fällt auf, dass im Gegensatz zum Spektrum des unspezifisch immobilisierten AFP Typ III das Reflexions-Absorptionsspektrum von spezifisch immobilisiertem AFP Typ III eine Si-O-Si-Streckschwingung bei 1126 cm^{-1} und bei ca. 1085 cm^{-1} aufweist, welche das Vorhandensein einer TESU-Silikat-Schicht belegt. Weiterhin ist entweder eine asymmetrische CH₃-Deformationsschwingung im Wellenzahlbereich von $1475 - 1435 \text{ cm}^{-1}$ oder eine CH₂-Deformationsschwingung im Wellenzahlbereich von $1485 - 1445 \text{ cm}^{-1}$ erkennbar. Außerdem ist eine eindeutige CH₂-Drehschwingung bei 1261 cm^{-1} und bei 1237 cm^{-1} im Spektrum der spezifisch immobilisierten AFP festzustellen. Ferner sind die Amid-I-Bande bei 1659 cm^{-1}

und die Amid-II-Bande bei 1542 cm^{-1} des AFP Typ III auf der aldehydfunktionalisierten Silikatschicht zu sehen.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, wie sich die Amid-Banden des gelösten AFP Typ III-Proteins gegenüber den spezifisch immobilisierten AFP Typ III-Proteinen verändern. In der Abbildung 5-38 sind die Lagen der Amid-I- und Amid-II-Bande des AFP Typ III in gelöstem Zustand unter Verwendung des Immobilisierungspuffers (0,05 M Carbonatpuffer) dargestellt. Hier ist auffallend, dass die Lage der Amid-I-Bande des immobilisierten gegenüber dem gelösten AFP Typ III von 1659 cm^{-1} auf 1646 cm^{-1} verschoben ist. Eine weitere Bandenverschiebung ist ebenfalls bei der Amid-II-Bande des immobilisierten AFP Typ III im Vergleich zu gelöstem AFP Typ III von 1542 cm^{-1} (Abbildung 5-38) auf 1548 cm^{-1} (zu erkennen).

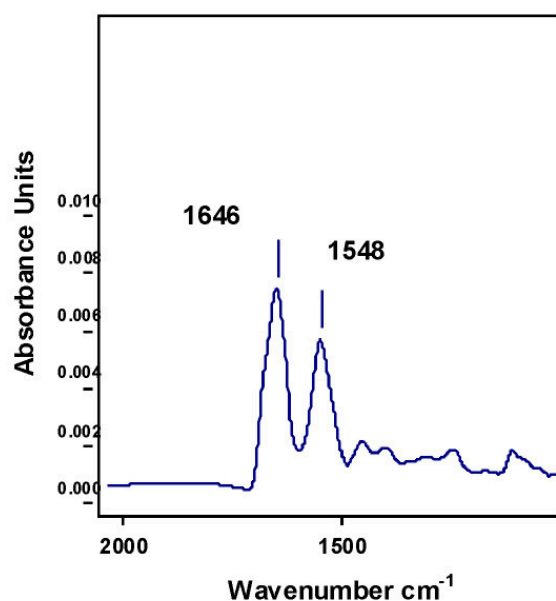


Abbildung 5-38: Lage der Amid-I- und Amid-II-Bande des AFP Typ III-Proteins in wässriger Lösung. (2 mg/5 mL in einer 0,05 M Carbonatpuffer-Lösung (pH = 9,6))

Ursache dieser Bandenverschiebungen sind Hydratationseffekte des Proteins und dadurch resultierende Wasserstoffbrückenbindungen im Protein. Beim Vergleich mit der Annahme, dass die adsorbierte Proteinschicht bei beiden Immobilisierungsarten ähnlich ist, ist feststellbar, dass die Intensität der Amid-I- und Amid-II-Bande der spezifisch immobilisierten AFP-Proteine intensiver als im Falle der unspezifisch immobilisierten AFP-Proteine ist. Diese höhere Intensität der Amid-Banden ist möglicherweise auf die eingeschlossenen Wassermoleküle in der Silikatschicht bei der spezifischen Immobilisierung zurückzuführen. Diese Vermutung wurde bereits mithilfe der QCM-D-Methode belegt.

Diese eingeschlossenen Wasserfilme stabilisieren die intramolekularen sowie die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und sind verantwortlich für eine bessere Konformationserhaltung des spezifisch immobilisierten AFP-Proteins im Vergleich zu unspezifisch immobilisierten AFP-Proteinen, mit einem geringeren Anteil an eingeschlossenem

Wasser. Diesbezüglich haben frühere Studien eindeutig gezeigt, dass die Stabilisierung der Proteine an Festkörperoberflächen nicht nur durch äußere funktionelle Gruppen beeinträchtigt wird, sondern auch von innen befindlichen funktionellen Gruppen abhängen, welche für die Einlagerung von Wasserfilmen verantwortlich sind.

Um Frostschutzeigenschaften der AFP-funktionalisierten Goldoberflächen zu überprüfen, wurden Proben aller Modifizierungsschritte der Immobilisierungsstrategie von der Anbindung des thiolbasierten Trialkoxysilans (Mercaptopropyl)trimethoxysilans bis zum abschließenden Aufbringen des aldehydbasierten Trialkoxysilans (Triethoxysilyl)undecanal einem Reiftest in einer Vereisungskammer unterzogen. Bevor die Resultate dieser Reiftests diskutiert werden, soll in diesem Abschnitt der Mechanismus der Reifbildung auf festen Oberflächen anhand der Abbildung 5-39 erläutert werden.

Im alltäglichen Leben kann man Reifbildung in kalten Wintermonaten auf festen Oberflächen wie z. B. auf Autoscheiben, Pflanzen und anderen Festkörperoberflächen beobachten. Die Reifbildung geschieht aus der Gasphase heraus an Festkörperoberflächen, deren Oberflächentemperatur unterhalb des Gefrierpunktes des kondensierten Wasserdampfes liegt [230]. Im Allgemeinen stellt Reifbildung einen äußerst komplexen Vorgang dar, welcher in zwei primäre Phasen unterteilt ist [230].

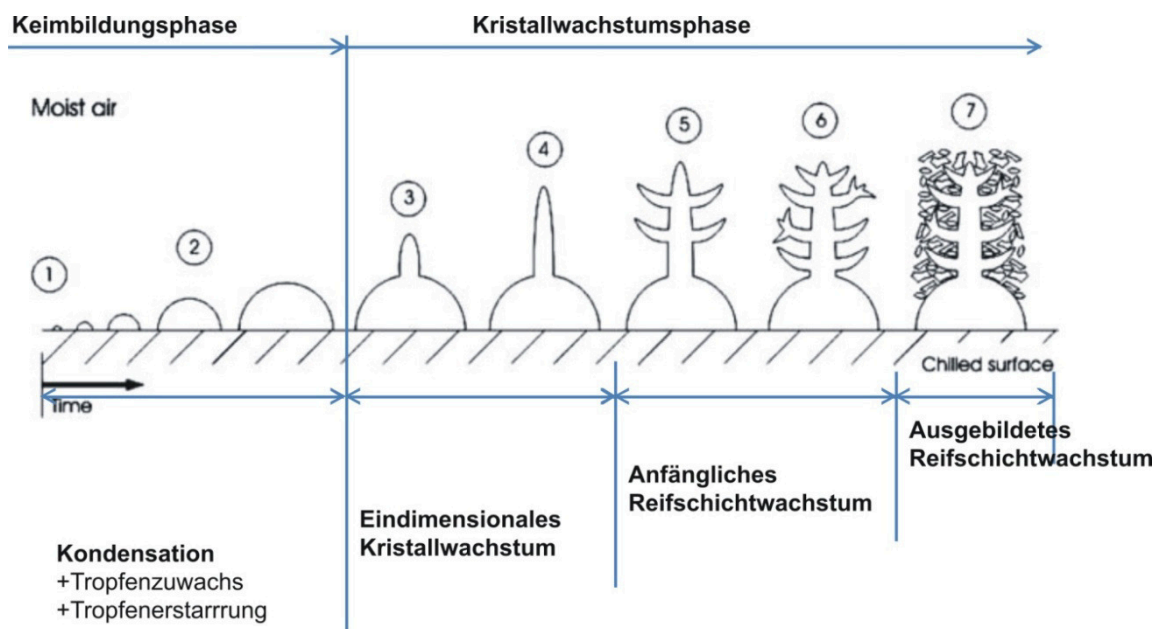


Abbildung 5-39: Phasen der Reifbildung nach Hayashi [230].

Die erste Phase wird Keimbildungsphase genannt und besteht hauptsächlich aus physikalischen Phänomenen wie Kondensation des Wasserdampfes, Tropfenwachstum und schließlich Tropfenerstarrung. In der zweiten, sogenannten Kristallwachstumsphase, werden mehrere nacheinander ablaufende physikalische Vorgänge definiert. Ein Vorgang davon ist eindimen-

sionales Kristallwachstum, bei dem die Eiskristalle auf aus Gasphase einkondensierten Wassertropfen in die Höhe wachsen und kleine eindimensionale Eiskristalle bilden. Nachfolgend wird dann Reifschichtwachstum eingeleitet. Abschließend erfolgt die Verdichtung der porösen Reifschichtstruktur, indem zunächst die auf der Reifschicht einkondensierten Wassertropfen in ihrer Wachstumsphase die maximale Größe erreichen. Dies führt zur Ausbildung eines Wasserfilms, da die Temperatur des einkondensierten Tropfens an der Grenzfläche Luft/Wassertropfen höher als die Temperatur der Festkörperoberfläche/Reifschicht-Grenzfläche ist. Die niedrigere Temperatur der oberen Reifschicht führt dazu, dass diese Schicht abschmilzt und aufgrund der Kapillarwirkung in die freien Regionen der porösen Reifschicht gelangt und dann zu deren Erstarrung führt. Dieser physikalisch bedingte Verdichtungsprozess lässt sich anhand der Erhöhung der Eisdichte feststellen [230]. Mit der Vorstellung, dass Anti-Frost-Proteine mit ihren Frostschutzeigenschaften die Keimbildungsphase beeinträchtigen und dadurch den gesamten Reifprozess mitbeeinflussen, wurden die mit Anti-Frost-Schutzproteinen präparierten Proben bei einem Reiftest auf ihre reifreduzierende Wirkung getestet. In der Abbildung 5-40 sind die Resultate der Reiftests der homogenen Au/SiO₂-Wafer-Oberfläche sowie der Au/SiO₂-Wafer-Oberfläche mit thiolbasierten MPTMS sowie Au/SiO₂-Wafer mit Abbildung 5-40 vorhydrolysierten MPTMS-Film dargestellt.

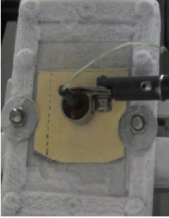
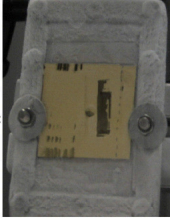
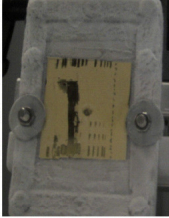
A)		B) Reif-Adhäsion-Test		C)	
Ergebnisse: Reifschichtdicke: -275 µm Eisadhäsionstest: -kleiner 2N		Ergebnisse: Reifschichtdicke: -175 µm Eisadhäsionstest: -kleiner 2N		Ergebnisse: Reifschichtdicke: -150 µm Eisadhäsionstest: -kleiner 2N	
					
Substratmaterial: Au/SiO ₂ -Wafer Probe: Referenzprobe Kryostattemperatur: -5 °C Lufttemperatur: +1 °C Rel. L.F.: 83 % Oberflächentemperatur nach 1h: -4 °C Oberflächentemperatur des Substrates nach 20 min: -2,5 °C Versuch am 30.03.12		Substratmaterial: Au/SiO ₂ -Wafer Probe: MPTMS vor Hydrolyse Kryostattemperatur: -5 °C Lufttemperatur: +1 °C Rel. L.F.: 83 % Oberflächentemperatur des Substrates nach 20 min: -2,0 °C Versuch am 30.03.12		Substratmaterial: Au/SiO ₂ -Wafer Probe: MPTMS nach Hydrolyse Kryostattemperatur: -5 °C Lufttemperatur: +1 °C Rel. L.F.: 83 % Oberflächentemperatur des Substrates nach 20 min: -2,0 °C Versuch am 30.03.12	

Abbildung 5-40: Resultate und Parameter der Reiftests mit dem unmodifizierten Au/SiO₂-Wafer, dem Au/SiO₂-Wafer mit MPTMS-Film sowie dem Au/SiO₂-Wafer mit hydrolysiertem MPTMS-Film

Als Erstes fällt in der Abbildung 5-40 auf, dass die Reifschichtdicke bei der unmodifizierten Au/SiO₂-Waferprobe (A) mit einem größeren polaren Anteil der Oberflächenenergie von 7,33 (±0,06) im Vergleich zu Proben B und C mit 3,74 (±0,06) bzw. 3,36 (0,08) aufwartet. Diese

Erkenntnis über eine Korrelation zwischen reifmindernder Wirkung und dem niedrigeren polaren Anteil der Oberflächenenergie wurde bereits von T. Ehlers diskutiert [231].

Weiterhin ist zu erkennen, dass Au/SiO₂ mit dem MPTMS+TESU-Film trotz einem niedrigeren polaren Anteil der Oberflächenenergie von 3,40 (±0,05) eine höhere Reifschichtdicke von 250 µm als Proben, die ebenfalls niedrigere polare Anteile der Oberflächenenergie zeigen (Tabelle 30).

Tabelle 30: Oberflächenenergie, polarer Anteil, disperser Anteil, Wasserkontaktwinkel (WK) und Reifschichtdicke (RD) der Proben der verschiedenen Modifizierungsschritte.

Probe	γ_s [mN/m]	γ_s^d [mN/m]	γ_s^p [mN/m]	WK [°]	RD [µm]
Au/SiO ₂ -Wafer	43,46 (±0,2)	36,13 (±0,06)	7,33(±0,06)	68,8 (±0,85)	275
Au/SiO ₂ -Wafer + MPTMS	40,19 (±0,25)	36,45 (±0,18)	3,74 (±0,06)	79,8 (±0,92)	175
Au/SiO ₂ -Wafer + MPTMS + Hydrolyse	41,60 (±0,18)	35,24 (±0,10)	3,36 (±0,08)	73,2 (±1,29)	150
Au/SiO ₂ -Wafer + MPTMS + TESU	26,80 (±0,21)	23,39(±0,17)	3,40 (±0,05)	92,4 (±0,90)	250

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in der weitmaschigen vernetzten Silikatschicht im Falle des MPTMS + TESU-Films mehr Wasser als bei dem MPTMS-Film auf dem Au/SiO₂-Wafer eingelagert wird, was möglicherweise das Reifwachstum verstärkt.


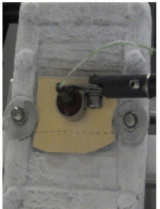

B) Reif-Adhäsion-Test					
A)		B)		C)	
Ergebnisse: Reifschichtdicke: -250 µm Eisadhäsionstest -kleiner 2N		Ergebnisse: Reifschichtdicke: -300 µm Eisadhäsionstest: -kleiner 2N		Ergebnisse: Reifschichtdicke: -größer 300 µm Eisadhäsionstest: -kleiner 2N	
Substratmaterial: Au/SiO ₂ -Wafer Probe: MPTMS+TESU Kryostattemperatur: -5 °C Lufttemperatur: +1 °C Rel. L.F.: 84 % Oberflächentemperatur des Substrates nach 20 min: -2,9 °C Versuch am 30.03.12		Substratmaterial: Au/SiO ₂ -Wafer Probe: MPTMS+TESU+AFP-III Kryostattemperatur: -5 °C Lufttemperatur: +1 °C Rel. L.F.: 83 % Oberflächentemperatur des Substrates nach 20 min: -2,9 °C Versuch am 30.03.12		Substratmaterial: Au/SiO ₂ -Wafer Probe: AFP-III Kryostattemperatur: -5 °C Lufttemperatur: +1 °C Rel. L.F.: 83 % Oberflächentemperatur des Substrates nach 20 min: -2,3 °C Versuch am 30.03.112	

Abbildung 5-41: Resultate und Parameter des Reiftests vom Au/SiO₂-Wafer mit TESU-Film, Au/SiO₂-Wafer + TESU-Film + AFP Typ III und Au/SiO₂-Wafer + AFP Typ III.

Im Anschluss wurden die mit Anti-Frost-Proteinen präparierten Proben dem Reiftest unterzogen. Nach dem Ablauf des Reiftests ergaben sich folgende Ergebnisse; die Reifschichtdicke bei der Probe mit den spezifisch immobilisierten Anti-Freeze-Proteinen (Abbildung 5-41 B)

betrug 300 μm und liegt somit 16,6 % höher als die Reifschichtdicke der Referenzprobe ohne Anti-Frost-Proteine (Abbildung 5-41 A). Bei der Probe mit den unspezifisch immobilisierten Proteinen (Abbildung 5-41 C) ist ebenfalls eine erhöhte Reifschichtdicke von 300 μm im Vergleich zu der Referenzprobe (Abbildung 5-40 A) mit einer Reifschichtdicken von 275 μm zu verzeichnen.

Tabelle 31: Wasserkontaktwinkel und Reifschichtdicke der verwendeten spezifisch und unspezifisch immobilisierten AFP Typ III-Proteine.

Probe	Wasserkontaktwinkel [°]	Reifschichtdicke [μm]
Au/SiO ₂ -Wafer + MPTMS + Hydrolyse + TESU	92,4 ($\pm 0,90$)	250
Au/SiO ₂ -Wafer + MPTMS + Hydrolyse + TESU + AFP Typ III	83,0 ($\pm 0,56$)	300
Au/SiO ₂ -Wafer	68,8 ($\pm 0,85$)	275
Au/SiO ₂ -Wafer + AFP Typ III	75,0 ($\pm 0,92$)	300
Reifschichtdicke (Messgenauigkeit ca. $\pm 50 \mu\text{m}$)		

Eine mögliche Ursache der erhöhten Reifbildung in Gegenwart von Anti-Frost-Proteinen auf Festkörperoberflächen könnte aus physikalischer Sicht unter dem Gesichtspunkt der Kondensationsphase eine erhöhte Anzahl an Keimbildungsstellen sein, welche durch die immobilisierten Proteine hervorgerufen werden. Keimbildungsstellen sind bei den mit Protein präparierten Proben bereits vorhanden und müssen nicht, im Gegensatz zu Proben ohne Proteine, durch die Kondensation des Wasserdampfes aus der Gasphase auf den unter den Gefrierpunkt des Wassers gekühlten Festkörperoberflächen erst ausgebildet werden. Was aus kinetischer Sicht dazu führt, dass der Ablauf der Keimbildungsphase beschleunigt wird. Außerdem sind auch bei der Probe mit einer erhöhten Anzahl von Keimbildungsstellen mehr einkondensierte Wassermoleküle zu vermuten, welche nach der Tropfenerstarrung zu einer steigenden Anzahl an Eiskristallen und zur eine Steigerung der Reifschichtdicke führt.

Eine weitere Erklärung könnte mit der Substratunterkühlung zusammenhängen, welche in Zusammenhang mit dem gebundenen Hydratwasser bei den immobilisierten Proteinen steht. Im Allgemeinen verbessert sich die Wärmeübertragung bei der Reifbildung durch vorhandene Wasserfilme auf den Substrat-Oberflächen sowie durch Erhöhung der Reifbildung. Außerdem zeigt sich, dass bei der Probe mit den zur Immobilisierung benötigten Filmen (TESU + MPTMS) ein sinkender Wasserkontaktwinkel von 92,4 ° ($\pm 0,90$) auf 83,0 ° ($\pm 0,56$) im Vergleich zu der Probe mit spezifisch immobilisierten AFP Typ III auftritt (Tabelle 31). Dies würde für eine steigende Hydrophilie mit einem steigenden polaren Anteil der Oberflächen-

energie sprechen. Diese Aussage bekräftigt die Erhöhung der Reifschicht durch eine Erhöhung der Hydrophilie der Substrat-Oberflächen mit Proteinen.

Wie schon am Anfang angedeutet, findet bei einer Proteinimmobilisierung eine dynamische Konformationsänderung der adsorbierten Proteine aufgrund der Protein-Festkörperoberflächen-Interaktionen statt. Je nach Protein führt diese Konformationsänderung und Orientierung während der Adsorption in der Regel aber nicht zwangsläufig zum Funktionsverlust. Im Falle der Anti-Frost-Proteine ist anzunehmen, dass diese durch die Fixierung an Festkörperoberflächen ihre dynamischen Freiheitsgrade verlieren, im Gegensatz zum Zustand in wässriger Lösung. Diese Veränderung der dynamischen Freiheitsgrade sowie die Konformationsänderung der immobilisierten Proteine könnte die für den Wirkmechanismus essenzielle eisbindende Oberfläche (IBS, engl. *ice-binding surface*) stark beeinträchtigen. Die fehlende Funktionswirkung spiegelt sich in einer größeren Reifschichtdicken der Probe wider.

Im Allgemeinen beruht dieser Wirkmechanismus auf der Theorie des Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus [86]. Wie die Wortzusammensetzung „Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus“ impliziert, geht man bei dieser Theorie davon aus, dass eine spezifische Adsorption der Anti-Frost-Proteine an der Eisoberfläche stattfindet und das Wachsen der Eiskristalle inhibiert, was Auswirkungen auf physikalische Kristallisationstemperatur vom Eis hat.

Die Spezifität der Proteine während der Adsorption spiegelt sich in der bereits oben erwähnten eisbindenden Oberfläche [185]. In diesem Zusammenhang wurde in der Studie von Z. Jia et al. [186] die Auswirkung einer Mutation der eisbindenden Aminosäurereste des AFP Typ III auf die Frostschutzaktivität untersucht. So berichten sie über einen Verlust der Frostschutzaktivität um 70-80 % durch die Substitution der Seitenketten wie Thr-15 gegen Ala und Thr-18 gegen Ala. Dieses Ergebnis deutet auf eine Empfindlichkeit der einzelnen wasserstoffbrückenbindenden Gruppen der eisbindenden Aminosäurereste bei der Wirkungsweise des Proteins hin.

Aus dieser Argumentation kann angenommen werden, dass die eisbindende Oberfläche der auf der Goldoberfläche immobilisierten Proteine aufgrund einer starken Konformationsänderung ihre dynamischen Eigenschaften massiv verliert und somit ihrer Funktion beim Reifprozess in der Kristallwachstumsphase nicht nachkommen kann. Inwieweit die immer noch angenommene Frostschutzwirkung der Anti-Frost-Proteine in wässriger Lösung bei den immobilisierten Anti-Frost-Proteinen an Festkörperoberflächen aus biologischer Sicht zu finden ist, kann alleine durch den Reiftest nicht geklärt werden. Dazu sind weitere Untersuchungen mit weiteren analytischen Methoden notwendig.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Arbeit befasst sich mit zwei Kernfragen zur Aktivität und Immobilisierung von Proteinen. Die erste Fragestellung geht dem Verständnis der Zusammenhänge der Aktivität des immobilisierten und des gelösten Anti-Frost-Protein Typ III nach. Die zweite Fragestellung dieser Dissertation bezieht sich auf das Verständnis der Zusammenhänge der Konformationsänderung und der enzymatischen Aktivität von Meerrettichperoxidase in Abhängigkeit von der Immobilisierung.

Bei der Untersuchung der Biofunktionalisierung einer Polyurethanoberfläche konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der über Glutaraldehyd spezifisch immobilisierten Meerrettichperoxidase im Vergleich zur unspezifisch immobilisierten signifikant höher liegt. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität die immobilisierte Proteindichte, die ausschlaggebend sein kann, zu diesem Zeitpunkt unberücksichtigt blieb.

Um die adsorptions-induzierte Konformationsänderungen besser untersuchen zu können wurde ein neuer spezifischer Immobilisierungsansatz mit den dazugehörigen Modifikationsschritten für Gold anstatt von Polyurethan als Substrat erarbeitet. Zur Untersuchung der Modifikationsschritte im Hinblick auf die spezifische Immobilisierung wurde eine oberflächensensitive Methode, die Polarisations-Modulations-Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (PM-IRRAS), eingesetzt.

Um die Adsorptionsdichte der Proteine an der Goldoberfläche im Falle der spezifischen und unspezifischen Immobilisierung zu bestimmen wurde die QCM-D-Methode eingesetzt. Im Anschluss wurde die Konformationsänderung der adsorbierten Proteine auf den Au-QCM-D-Sensoren unter Verwendung von PM-IRRAS untersucht. Die Schlussfolgerung dieser Untersuchung ist, dass im Falle der unspezifischen Immobilisierung eine stärkere Konformationsänderung im Vergleich zur spezifischen Immobilisierung stattfindet. Entgegen der logischen Erwartung, dass eine Konformationsänderung mit einem Verlust der enzymatischen Aktivität einhergeht, korreliert offenbar eine strukturelle Veränderung im Falle der unspezifischen Immobilisierung nicht mit der enzymatischen Aktivität der Meerrettichperoxidase.

Nach der Untersuchung der Meerrettichperoxidase wurde dieselbe Versuchsreihe mit einem Anti-Frost-Protein Typ III vom Fisch Ocean Pout (*Macrozoarces americanus*) durchgeführt. AFP Typ III ist für die erste in dieser Arbeit formulierte Fragestellung ausschlaggebend. Zur Bestimmung der Aktivität des AFP Typ III im gelösten Zustand wurden Sonokristallisation und Dynamische Leistungs-Differenzkalorimetrie (DSC) eingesetzt. Zur Überprüfung der Detektierbarkeit der thermischen Hysterese mittels Sonokristallisation wurde zuerst die ther-

misches Hysterese von AFP Typ III in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht. Die Resultate zeigen, dass die dabei gemessenen Werte mit Werten anderer Messmethoden in einem vergleichbaren Bereich liegen. Weiterhin wurde die Empfindlichkeit dieser Messvorrichtung durch eine Untersuchung des pH- und Temperatur-Einflusses auf die thermische Hysterese des AFP Typ III getestet. Hier geht schlussfolgernd hervor, dass eine permanente strukturelle Entfaltung des AFP Typ III bei einer thermischen Behandlung im Temperaturbereich von 20 °C bis 40 °C stattfindet, welche mit steigender Temperatur kontinuierlich zum Aktivitätsverlust führt.

Die DSC-Methode ergänzte in der vorliegenden Arbeit die Sonokristallisation, indem sie neben der einheitlichen Bestimmung der thermischen Hysterese die Untersuchung des Einflusses der Anti-Frost-Proteine auf das Kristallisationsverhalten von Wasser mit unterschiedlichen Eis-Gehalten ermöglichte. Dabei wurde mittels DSC herausgefunden, dass die thermische Hysterese des AFP Typ III in einer starken Korrelation mit dem Eisgehalt des Zweikomponentensystems (Wasser/Eis) steht.

Um schließlich die Aktivität des AFP Typ III im immobilisierten Zustand zu testen, wurden Reiftestes in einer Klimakammer durchgeführt. Die Ergebnisse der Reiftests zeigen keinerlei Unterschiede im Hinblick auf die Reifschichtdicke zwischen spezifisch und unspezifisch immobilisierten AFP Typ III trotz starker Differenzen der molekularen Konformation. Die infrarot-spektroskopische Konformationsänderungsanalyse des immobilisierten Proteins zeigt, dass die Konformationsänderung im Falle der unspezifisch immobilisierten AFP-Proteine ausgeprägter ist als im Falle der spezifisch immobilisierten AFP-Proteine.

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Polarisations-Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie für die Untersuchung der Konformationsänderung der Proteine nach der Adsorption an Festkörperoberflächen bestens geeignet ist. Um jedoch zeitaufgelöste Protein-Adsorptionsprozesse unter wässrigen Bedingungen, welche als Grundvoraussetzung für das Verständnis der adsorptions-induzierten Konformationsänderung der Proteine gelten, analysieren zu können, bedarf es der Entwicklung einer neuartigen infrarot-spektroskopischen Methode für solche Zwecke. Durch diese Methode ließe sich neues Wissen über die Einflüsse der Oberflächenchemie auf die Proteinkonformation generieren und eine gezielte Auswahl an Festkörperoberflächen treffen, um die Proteinadsorption und die Konformationsänderungen der Proteine an Festkörperoberflächen gezielt einzustellen.

Literaturverzeichnis

- [1] A. H. Martin, M. B. J. Meinders, M. A. Bos, M. A. Cohen Stuart, T. van Vliet *Langmuir* **2003**, (19), 2922-2928.
- [2] C. Wang, M. Micic, M. Ensor, S. Daunert, R. M. Leblanc *J. Phys. Chem. B* **2008**, (112), 4146-4151.
- [3] J. Zheng, B. Desbat, V. K. Rastogi, S. S. Shah, J. J. DeFrank, R. M. Leblanc *Biomacromolecules* **2006**, (7), 2806-2810.
- [4] K. P. Fears, R. A. Latour *Langmuir* **2009**, (24), 13926-13933.
- [5] V. Lebec, J. Landoulsi, S. Boujday, C. Poleunis, C. -M. Pradier, A. Delcorte *J. Phys. Chem.* **2013**, (117), 11569-11577.
- [6] H. Hähl, F. Evers, S. Grandthyll, M. Paulus, Ch. Sternemann, P. Loskill, M. Lessel, A. K. Hüsecken, T. Brenner, M. Tolan, K. Jacobs *Langmuir* **2012**, (28), 7747-7756.
- [7] K. Spieß, Charakterisierung und Funktionalisierung von Filmen aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen *Dissertation*, Universität Bayreuth, **2012**.
- [8] H. B. Beismann, I. Grunwald, A. B. Kesel, P. M. Kunz, T. Schultz, K. Slenzka, J. Tschernjaew, S. N. Gorb, D. Voigt, Beuth Verlag GmbH **2011**.
- [9] D. M. Dankbar Photochemische Oberflächenmodifizierung *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, **2006**.
- [10] A. Sethuraman, M. Han, R. S. Kane, G. Belfort *Langmuir* **2004**, (20), 7779-7788.
- [11] H. Beismann, H. -G. Beyer, I. Boblan, R. Erb, M. Fischer, M. Herdy, A. Jordan, A. Kesel, S. Menzel, M. Mörtl, G. Pohl, H. Seitz, O. Speck, T. Speck, I. Tesari, J. Tschernjaew, M. Wirth, Beuth Verlag GmbH **2011**.
- [12] T. Zwiég, H. Worch, "Erarbeitung einer Technologie zur antiadhäsiven Eiskristallbildung auf metallischen Werkstoffoberflächen," BMBF **2005**.
- [13] E. Howard, M. Blakeley, T. Petrova, A. Podjarny *J. Mol. Recogn.* **2011**, (24), 724-732.
- [14] L. De Stefano, I. Rea, E. De Tommasi, I. Rendina, L. Rotiroti, M. Giocondo, S. Longobardi, A. Armenante, P. Giarina *Eur. Phys. J. E* **2009**, (31), 181-185.
- [15] A. Greß, Funktionalisierte Poly(2-oxazoline): Kontrollierte Synthese, bioinspirierte Strukturbildung und Anwendungen *Dissertation*, Universität Potsdam, **2008**.
- [16] A. P. Esser-Kahn, V. Trang, M. B. Francis *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, (132), 13264-13269.

- [17] J. W. Steed, J. L. Atwood *Supramolecular Chemistry*, Wiley: Chichester, **2005**.
- [18] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, (162), 87-106.
- [19] W. Norde *Biopolymers at interfaces*, Marcel Dekker: Basel, **2003**, (102), 21-43.
- [20] H. G. Elias *Makromoleküle, sechste, vollständig überarbeitete Auflage Band 3*, Wiley: Weinheim **2001**, 455-480.
- [21] C. A. Schalley *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley: Weinheim **2007**, 2-4.
- [22] C. Jaussi *Biochemie*, Springer Verlag: Berlin-Heidelberg, **2005**, 5-8.
- [23] A. D. Robertson, K. P. Murphy *Chem. Rev.* **1997**, (97), 1251-1267.
- [24] W. Kauzmann *Adv. Prot. Chem.* **1959**, (14), 1-63.
- [25] Y. Nozaki, C. Tanford *J. Biol. Chem.* **1971**, (246), 2211-2217.
- [26] P. Christen, R. Jaussi *Biochemie*, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg **2005**, 3-18.
- [27] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, (37), 205-211.
- [28] L. Pauling, R. B. Corey *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, (37), 729-740.
- [29] C. Bischof, W. Possart *Adhäsion* **1983**, Akademie-Verlag Berlin.
- [30] A. A. Vertegel, R. W. Siegel, J. S. Dordick *Langmuir* **2004**, (20), 6800-6807.
- [31] P. M. Biesheuvel, M. van der Veen, W. Norde *J. Phys. Chem.* **2005**, (9), 4172-4180.
- [32] C. Czeslik *Phys. Chem.* **2004**, (218), 771-801.
- [33] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt, M. Grunze *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, (31), 9359-9366.
- [34] L. Cao *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley: Weinheim **2005**, 169-189.
- [35] A. G. Richter, I. Kuzmenko *Langmuir* **2013**, (29), 5167-5180.
- [36] C. Reichhart, C. Czeslik *Colloids Surf., B* **2010**, (75), 612-616.
- [37] K. P. Fears, B. Sivaraman, G. L. Powell, Y. Wu, R. A. Latour *Langmuir* **2009**, (25), 9319-9327.
- [38] A. M. Klibanov *Science* **1983**, (219), 722-727.
- [39] G. Ertl, H. Knözinger, F. Schüth, J. Weitkamp *Handbook of Heterogeneous Catalysis*, Wiley: **2008**, 644-655.
- [40] W. Tischer, F. Wedekind *Biocatalysis From Discovery to Application*, Springer Verlag: Berlin Heidelberg **1999**, 96-126.

- [41] G. T. Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: Amsterdam, **2008**, 3-35.
- [42] J. O. Edwards, R. G. Pearson *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, (1), 16-24.
- [43] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen *Biomacromolecules* **2007**, (6), 1775-1789.
- [44] R. Beckert, H. Becker *Organikum*, Wiley: Weinheim **2009**, 461-629.
- [45] T. Krause, Herstellung von bioabbaubaren Tensiden durch reduktive Aminierung von Isomaltulose *Dissertation*, Technische Universität Darmstadt, **1999**.
- [46] K. P. C Vollhardt, N. E. Schore *Organische Chemie*, Wiley: Weinheim **2005**, 1116-1117.
- [47] P. Sykes *Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie*, Wiley: Weinheim **1988**, 255-257.
- [48] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, (12), 2897-2904.
- [49] L. Peng, G. J. Calton, J. W. Burnett *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1987**, (14), 91-99.
- [50] H. H. Weetall *Science* **1969**, (166), 615-617.
- [51] H. H. Weetall *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1993**, (41), 157-188.
- [52] F. Beari, M. Brand, P. Jenkner, R. Lehnert, H. J. Metternich, J. Monkiewicz, H.W. Siesler *Journal of Organometallic Chemistry* **2001**, (625), 208-216.
- [53] P. Stegmaier Surfaces for Functional and Patterned Immobilization of Proteins *Dissertation*, Universität Stuttgart, **2007**.
- [54] G. T. Hermanson *Bioconjugate Techniques*, **2008**, 562-581.
- [55] F. D. Osterholtz, E. R. Pohl *J. Adhesion Sci. Technol.* **1992**, (6), 128-149.
- [56] M.-C. B. Salon, M. N. Belgacem *Phosphorus, Sulfur and Silicon, and the Related Elements* **2011**, (186), 240-254.
- [57] G. L. Witucki *A Journal of Coatings Technology* **1993**, (65) 57-60.
- [58] L. G. Britcher, D. C. Kehoe, J. G. Matisons, R. St. C. Smart, A. G. Swincer *Langmuir* **1993**, (9) 1609-1613.
- [59] S. J. Hinder, C. Lowe, J. T. Maxted, J. F. Watts *Progress in Organic Coating* **2005**, (54), 104-112.
- [60] M. Horgnies, E. Darque-Ceretti *Progress in Organic Coating* **2006**, (55), 27-34.
- [61] M. J. Owen, P. J. Smith *Journal of Adhesion Science and Technology* **1994**, (8), 1063-1075.

- [62] K. Tsougeni, A. Tserepi, G. Boulouis, V. Constantoudis, E. Gogolides *Plasma Processes and Polymers* **2007**, (4), 398-405.
- [63] C. C. Wu, C. Y. Yuan, S. J. Ding *Surface and Coatings Technology* **2011**, (205), 3182-3189.
- [64] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron *BioTechniques* **2004**, (37), 790-802.
- [65] W. R. Thompson, M. Cai, M. Ho, J. E. Pemberton *Langmuir* **1997**, (13), 2291-2302.
- [66] A. Morneau, A. Manivannan, C. R. Cabrera *Langmuir* **1994**, (10), 3940-3942.
- [67] W. R. Thompson, J. E. Pemberton *Chem. Mater.* **1993**, (5), 241-244.
- [68] D. J. Lavrich, S. M. Wetterer, S. L. Bernasek, G. Scoles *J. Phys. Chem. B.* **1998**, (102), 3456-3465.
- [69] M. Glodde, A. Hartwig, O.-D. Hennemann, W.-D. Stohrer *International Journal of Adhesion and Adhesives* **1998**, (18), 359-364.
- [70] M. J. Tarlov, J. G. Newman *Langmuir* **1992**, (8), 1398-1405.
- [71] M. Lee, N. Zine, A. Baraket, M. Zabalab, F. Campabadal, R. Caruso, M. G. Trivella, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, (175), 201-207.
- [72] O. Penon, S. Novo, S. Durán, E. Ibañez, C. Nogués, J. Samitier, M. Duch, J. A. Plaza, L. Pérez-García *Bioconjugate Chem.* **2012**, (23), 2392-2402.
- [73] R. Tian, S. Regonda, J. Gao, Y. Liu, W. Hu *Lab Chip.* **2011**, (11), 1952–1961.
- [74] I. Yamazaki, M. Tamura, R. Nakajima *Molecular and Cellular Biochemistry* **1981**, (40), 143-153.
- [75] N. Loew, Meerrettich Peroxidase Modifikationen und Anwendungen in Biosensoren *Dissertation*, Universität Potsdam, **2008**.
- [76] G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, J. Hajdu *Nature* **2002**, (417), 463-468.
- [77] N. C. Veitch *Phytochemistry* **2004**, (65), 249-259.
- [78] Y. Yin, N. J. Nosworthy, H. Youssef, B. Gong, M.M.M. Bilek, D.R. McKenzie *Thin Solid Films* **2009**, (517), 5343–5346.
- [79] W. Al-Azzam, A. Pastrana, Y. Ferrer, Q. Huang, R. Schweitzer-Stenner, K. Griebenow *Biophysical Journal* **2002**, (83), 3637-3651.

- [80] M. Gajhede, D. S. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos *Nature Structure Biology* **1997**, (4), 1032-1038.
- [81] D. G. Pina, A. V. Shnyrova, F. Gavilanes, A. Rodriguez, F. Leal, M. G. Roig, I. Y. Sakharov, G. G. Zhadan, E. Villar, V. L. Shnyrov *Eur. J. Biochem.* **2001**, (268), 120-126.
- [82] R. W. Bally, T. C. J. Gribnau, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1989**, (27), 791-796.
- [83] P. D. Josephy *Environmental Health Perspectives* **1985**, (64), 171-178.
- [84] C. Budke, Hemmung der Eiskristallisation in wässrigen Lösungen durch Antieisfrierglykopeptide *Dissertation*, Universität Bielefeld, **2010**.
- [85] J. Barrett, *Int J Biochem Cell Biol.* **2001**, (33), 105-117.
- [86] E. Kristiansen, K. E. Zachariassen *Cryobiology* **2005**, (51), 262 - 280.
- [87] S. Ebbinghaus, K. Meister, B. Born, A. L. DeVries, M. Gruebele, M. Havenith, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, (132), 12210-12211.
- [88] P. F. Scholander, L. Vandam, J. W. Kanwisher, H. T. Hammel, M. S. Gordon *J. Cell. Comp. Physiol.* **1957**, (49), 5-24.
- [89] A. L. DeVries, D. E. Wohlschlag *Science* **1969**, (163), 1073-1075.
- [90] R. Schneppenheim, H. Theede *Polar Biol.* **1982**, (1), 115-123.
- [91] D. A. Wharton *Journal of Insect Physiology* **2011**, (57), 1090-1095.
- [92] D. J. Simpson, M. Smallwood, S. Twigg, C. J. Doucet, J. Ross, D. J. Bowles *Cryobiology* **2005**, (51), 230-234.
- [93] J. A. Gilbert, P. L. Davies, J. Laybourn-Parry *FEMS Microb. Lett.* **2005**, (245), 67-72.
- [94] M. Bayer-Giraldi, I. Weikusat, H. Besir, G. Dieckmann *Cryobiology* **2011**, (63), 210-219.
- [95] V. Bouvet, R. N. Ben *Cell Biochem Biophys* **2003**, (39), 133-144.
- [96] D. S. Yang, W. C. Hon, S. Bubanko, Y. Xue, J. Seetharaman, C. L. Hew, F. Sicheri *Biophys. J.* **1998**, (74), 2142-2151.
- [97] F. D. Sönnichsen, C. I. DeLuca, P. L. Davies, B. D. Sykes *Structure* **1996**, (4), 1325-1337.
- [98] M. Griffith, V. Ewart *Biotechnology Advances* **1995**, (13), 375-402.
- [99] L. Garth, S. V. Fletcher, Y. W. Goddard *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, (30), 17-28.
- [100] B. Rubinsky, A. Arav, M. Mattioli, A. L. Devries *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

- 1990, (173), 1369-1374.
- [101] S. J. Du, Z. Y. Gong, G. L. Fletcher, M. A. Shears, M. J. King, D. R. Idler, C. L. Hew *Bio/Technology* **1992**, (10), 176-181.
- [102] G. Amir, B. Rubinsky, Y. Kassif, L. Horowitz, A. K. Smolinsky, J. Lavee *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **2003**, (24), 292-297.
- [103] J. N. Daraboina, J. Ripmeester, V. K. Walker, P. Englezos *Energy Fuels* **2011**, (25), 4398-4404.
- [104] K. Siegmann, A. Kaufmann, M. Hirayama *Anti-freeze Beschichtungen für Rotorblätter von Windenergieanlagen-Schlussbericht 260051*, Winterthur **2006**.
- [105] A. P. Esser-Kahn, V. Trang, M. B. Fancis *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, (132), 13264-13269
- [106] A. Elliott, E. J. Ambrose *Nature* **1950**, (165), 921-922.
- [107] A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey *Biochemistry* **1990**, (29), 3303-3308.
- [108] W. P. Ulrich, H. Vogel *Biophysical Journal* **1999**, (76), 1639-1647.
- [109] J. Kraut *Annual Review of Biochemistry* **1965**, (34), 247-268.
- [110] D. D. Boehr, H. J. Dyson, P. E. Wright *Chem. Rev.* **2006**, (106), 3055-3079.
- [111] N. Greenfield, G. D. Fasman *Biochemistry* **1969**, (10), 4108-4116.
- [112] J. L. Lippert, D. Tyminski, P. J. Desmeules *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, (22), 7075-7080.
- [113] H. -J. Steinhoff *Frontiers in Bioscience* **2002**, (7), 97-110.
- [114] C. William, Jr. Reisdorf, S. Krimm *Biophysical Journal* **1995**, (69), 271-273.
- [115] M. Holtzhauer *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg **1996**, 70-201.
- [116] N. Sreerama, R. W. Woody *Analytical Biochemistry* **2000**, (287), 252-260.
- [117] G. J. Puppels, J. H. F. Olminkhof, G. M. J. Segers-Nolten, C. Otto, F. F. M. de Mul, J. Greve *Experimental Cell Research* **1991**, (195), 361-367.
- [118] F. Lottspeich, J. W. Engels *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **2009**, 503-514.
- [119] E. W. Framton, D. Billen *Radiation Research* **1966**, (28), 109-120.
- [120] K. Manda, M. Ueno, K. Anzai *Jouranal of Pineal Research* **2007**, (42), 386-393.
- [121] T. Kottke *Bunsen-Magazin* **2012**, (2), 38-43.
- [122] R. Riek, K. Pervushin, K. Wüthrich *TIBS* **2000**, (25), 462-468.

- [123] M. Refaee, T. Tezuka, K. Akasaka, M. P. Williamson *J. Mol. Biol.* **2003**, (327), 857-865.
- [124] J. Santoro, C. Gonzalez, M. Bruix, J. L. Neira, J. L. Nieto, J. Herranz, M. Rico *J. Mol. Biol.* **1993**, (229), 722-734.
- [125] K. Hauser, FTIR-Differenzspektroskopie zur Untersuchung von Konformationsänderungen in Proteinen *Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Breisgau, **2000**.
- [126] S. Krimm, J. Bandekar *Adv. Protein Chem.* **1986**, (38), 181-364.
- [127] W. K. Surewicz, J. H. H. Mantsch, D. Chapman *Biochemistry* **1993**, (32), 389-394.
- [128] V. Schultheis, Modelle für die Identifizierung der Konformationszustände von Proteinen und für die Berechnung ihrer Infrarotspektren *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München, **2008**.
- [129] J. Jakes, S. Krimm *Spectrochimica Acta* **1969**, (27), 19-34.
- [130] A. Barth *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, (1767), 1073-1101.
- [131] T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima *J. Chem. Phys.* **1956**, (24), 408-418.
- [132] J. Bandekar *Biochimica et Biophysica Acta*. **1992**, (1120), 123-143.
- [133] J. Kong, S. Yu *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2007**, (39), 549-559.
- [134] S. Yu. Venyaminov, N. N. Kalnin *Biopolymers* **1990**, (30), 1243-1257.
- [135] P. B. Tooke *Trends in analytical Chemistry* **1988**, (7), 130-136.
- [136] S. Wi, P. Pancoska, T. A. Kreiderling *Biospectroscopy* **1998**, (4), 93-106.
- [137] K. Rahmelow, W. Hübner *Anal. Biochem.* **1996**, (241), 5-13.
- [138] F. Dousseau, M. Pezolet *Biochemistry* **1990**, (29), 8771-8779.
- [139] W. Norde *Biopolymers at interfaces*, Marcel Dekker: Basel, **2003**, (102), 641-669.
- [140] R. G. Greenler *The Journal of Chemical Physics* **1966**, (44), 310-315.
- [141] T. Buffeteau, B. Desbat, D. Blaudez, J. M. Turlet *Appl. Spectrosc.* **2000**, (54), 1646-1650.
- [142] M. A. Ramin, G. L. Bourdon, N. Daugey, B. Bennetau, L. Vellutini, T. Buffeteau *Langmuir* **2011**, (27) 6076-6084.
- [143] T. Buffeteau, B. Desbat, J.-M. Turlet *Mikrochim. Acta* **1988**, (95), 23-26.
- [144] E. Hecht *Optik* Wissenschaftsverlag: Oldenbourg **2009**, (17-55), (63-144), (151-240), (529-615).

- [145] W. G. Golden, D. D. Saperstein, M. W. Severson, J. Overend *J. Phys. Chem.* **1984**, (88), 574-580.
- [146] „<http://www.ir-spektroskopie.de/techniken/irras/grundlagen.html>“, [Online].
- [147] T. Buffeteau, B. Desbat, J. M. Turlet *Applied Spectroscopy* **1991**, (45), 380-389.
- [148] N. Maeda *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, (1), 4-58.
- [149] A. H. Martin, M. B. J. Meinders, M. A. Bos, M. A. C. Stuart, T. van Vliet *Langmuir* **2003**, (7), 922-2928.
- [150] A. Banc, B. Desbat, D. Renard, Y. Popineau, C. Mangavel, L. Navailles *Langmuir* **2007**, (23), 13066-13075.
- [151] B. MaterialScience, *Sicherheitsdatenblatt nach Verordnung (EG) Nr. 1907/2006: Bayhydrol A 242*, **2008**.
- [152] B. MaterialScience, *Sicherheitsdatenblatt nach Verordnung (EG) Nr. 1907/2006: Bayhydrol 3100*, **2009**.
- [153] BYK-Chemie, *Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006: BYK-375*, **2011**.
- [154] A. Gaede-Koeler, A. Kreider, P. Canfield, M. Kleemeier, I. Grunwald *Anal. Chem.* **2012**, (84), 10229-10235.
- [155] P. Wand, FTIR-spektroskopische Analyse der Sekundärstrukturveränderungen von Proteinen *Bachelorarbeit*, Universität Bremen, **2011**.
- [156] F. Beari, M. Brand, P. Jenkner, R. Lehnert, H. J. Metternich, J. Monkiewicz, H. W. Siesler *Journal of Organometallic Chemistry* **2001**, (625), 208–216.
- [157] M.-C. B. Salon, M. N. Belgacem *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* **2011**, (186), 240-254
- [158] G. T. Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: Amsterdam **2008**, 265-268.
- [159] D. A. Puleo *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, (29), 951-957.
- [160] S. W. Park, Y. I. Kim, K. H. Chung, S. I. Hong, S. W. Kim, *Reactive and Functional Polymers* **2002**, (51), 79-92.
- [161] S. F. Torabi, K. Khajeh, S. Ghasempur, N. Ghaemi, S. O. R. Siadat *Journal of Biotechnology* **2007**, (131), 111-120.
- [162] G. T. Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: Amsterdam **2008** 134-135.

- [163] G. T. Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: Amsterdam **2008** 231-233.
- [164] B. Ibarlucea, C. Fernandez-Sanchez, S. Demming, S. Büttgenbach, A. Llobere *Analyst* **2011**, (136), 3496-3502.
- [165] O. Seitz, P. G. Fernandes, R. Tian, N. Karnik, H.-C. Wen, H. Stiegler, R. A. Chapman, E. M. Vogel, Y. J. Chabal *J. Matter Chem.* **2011**, (21), 4384-4392.
- [166] A. Kreider, B. Weber, V. Stenzel, C. Tornow, I. Grunwald *European Coatings Journal* **2011**, (5), 34-39.
- [167] *B. nanosciences*. <http://209.200.249.145/index.php?id=290>.
- [168] D. K. Owens, R. C. Wendt *J. Appl. Polymer Sci.* **1969**, (13), 1741-1747.
- [169] B. Optics, PMA50 Bedienungsanleitung, 1-32.
- [170] J. Baardsnes, P. L. Davies *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, (1601), 49-54.
- [171] C. L. Hew, D. Slaughter, S. B. Joshi, G. L. Fletcher, V. S. Ananthanarayanan *J. Comp. Physic. B.* **1984**, (155), 81-88.
- [172] Y. Celik, L. A. Graham, Y. F. Mok, M. Bar, P. L. Davies *I. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, (107), 5423-5428.
- [173] T. N. Hansen and J. G. Baust *Biochimica et Biophysica Acta* **1988**, (957) 217-221.
- [174] T. N. Nansen, A. L. Devries, J. G. Baust *Biochemica et Biophysica Acta* **1991**, (1079), 169-173.
- [175] P. W. Wilson, J. W. Arthur and A. D. J. Haymet *Biophysical Journal* **1999**, (77), 2850-2855.
- [176] A. Kordylla, G. Schembecker, F. Tumakaka und G. Sadowski *Chemie Ingenier Technik* **2006**, (78), 1341-1342.
- [177] R. Mettin, B. Lindinger *Phys. Unserer Zeit* **2008**, (39), 9-10.
- [178] V. S. Nalajala, V. S. Moholkar *Ultrasonics Sonochemistry* **2011**, (18), 345-355.
- [179] M. Köhler, *Berichte aus der Physik*, Stuttgart: Shaker Verlag, Aachen, 1999.
- [180] M. Lu, B. Wang, Zh. Li, Y. Fei, L. Wei, Sh. Gao *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2002**, (67), 689-698.
- [181] X. Mao, Z. Liu, H. Li, J. Ma and F. Zhang *Therm. Anal. Calorim.* **2011**, (104), 343-349.
- [182] N. Amornwittawatt, S. Wang, J. Banatlao, M. Chung, E. Velasco, J. G. Duman, X. Wen *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, (1794), 341-346.

- [183] E. Baruch, Y. Mastai, "Antifreeze Properties of Polyglycidol Block Copolymers," *Macromol. Rapid. Commun.* **2007**, (28), 2256-2261.
- [184] A. B. Siemer, K.-Y. Huang, A. E. McDermott, *PNAS* **2010**, (107), 17580-17585.
- [185] E. I. Howard, M. P. Blakeley, M. Haerthlein, I. P.-Haertlein, A. Mitschler, S. J. Fisher, A. C. Siah, A. G. Salvay, A. Popov, C. M. Dieckmann, T. Petrova, A. Podjarny *J. Mol. Recognit.* **2011**, (24), 724-732.
- [186] Z. Jia, C. I. DeLuca, H. Chao, P. L. Davies *Nature* **1996**, (384), 285-288.
- [187] K. Meister, S. Ebbinghaus, Y. Xu, J. G. Duman, A. L. DeVries, M. Gruebele, D. M. Leitner, M. Havenith *PNAS* **2012**, (110), 1617-1622).
- [188] Y. Mastai, J. Rudloff, H. Cölfen, M. Antonietti *Chemphyschem* **2002**, (3), 119-123.
- [189] E. Baruch, Y. Mastai *Macromol. Rapid. Commun.* **2007**, (28), 2256-2261.
- [190] Y. E. Yavuz, M. Antonietti, H. G. Börner *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, (27), 1660-1664.
- [191] C. Zhang, H. Zhang, L. Wang, H. Yao *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, (55), 4698-4703.
- [192] S. Hahn, S.-S. Kim, C. Lee, M. Choa, *J. Chem. Phys.* **2005**, (123), 1-10.
- [193] A. Adochitei, G. Drochioiu *Rev. Roum. Chim.* **2011**, 56 (8), 783-791.
- [194] Yu. N. Chirgadze, N. A. Nevskaya *Biopolymers* **1976**, (15), 627-636.
- [195] P. Mandal, N. Eremina, A. Barth *J. Phys. Chem. B* **2012**, (116), 12389-12397.
- [196] Y. Moriyama, Y. Kawasaka, K. Takeda *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, (257), 41-46.
- [197] R.-H. Chen, Y.-C. Ker, C.-S. Wu *Agric. Biol. Chem.* **1990**, (54), 1165-1176.
- [198] L. de La Fourniere, O. Nosjean, R. Buchet, B. Roux *Biochimica et Biophysica Acta* **1995**, (1248), 186-192.
- [199] G. Feller *J. Phys.: Condens Matter* **2010**, (22), 1-17.
- [200] R. Vogel, F. Siebert *Biochemistry* **2002**, (41), 3536-3545.
- [201] V. S. Ananthanarayanan, D. Slaughter, C. L. Hew *Biochimica et Biophysica Acta* **1986**, (870) 154-159.
- [202] O. Carcia-Arribas, R. Mateo, M. M. Romczak, P. L. Davies, M. G. Mateu *Protein Science* **2007**, (16), 227-238.
- [203] D. E. Andersons, W. J. Becktel, F. W. Dahlgust *Biochemistry* **1999**, (29), 2403-2408.
- [204] H. Chao, C. I. DeLuca, P. L. Davies, B. D. Sykes, F. D. Sönnichsen *Protein Science*

- 1994**, (3), 1760-1769.
- [205] K. Rieß, Plasmamodifizierung von Polyethylen *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, **2001**.
- [206] Y. Zhang, *J. Ing. Eng. Chem.* **2002**, (8), 236-240.
- [207] X. Song, Ji. Zhai, Y. Wang, L. Jiang *J. Colloid Interface Sc.* **2006**, (298), 267-273.
- [208] S.-J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer *Langmuir* **1998**, (19), 5507-5516.
- [209] M. J. Hearn, B. D. Ratner, D. Briggs *Macromolecules* **1988**, (29), 2950-2959.
- [210] M. Etienne, A. Walcarius *Talanta* **2003**, (59), 1173-1188.
- [211] A. A. Golub, A. I. Zubenko, B. V. Zhmud *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, (179), 482-487.
- [212] Z. Xu, Q. Liu, J. A. Finch *Applied Surface Science* **1997**, (120), 269-278.
- [213] T. A. Dang, R. Gnanasekaran, D. D. Deppe *Surface and Interface Analysis* **1992**, (18), 141-146.
- [214] A. Kreider, K. Richter, S. Sell, M. Fenske, C. Tornow, V. Stenzel, I. Grunwald *Applied Surface Science* **2013**, (273), 562-569.
- [215] A. L. Cordeiro, S. Zschoche, A. Janke, M. Nitschke, C. Werner *Langmuir* **2009**, (25), 1509-1517.
- [216] Z. Shourgashti, M. Khorasani, S. Khosroshahi *Radiation Physics and Chemistry* **2010**, (79), 947-952.
- [217] A. Toth, I. Bertoti, M. Blazso, G. Banhegyi, A. Bognar, P. Szaplonecz *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, (52), 1293-1307.
- [218] R. Cartarius, Bioabbaubare Tenside durch reduktive Aminierung von Isomaltulose - Katalysator- und Verfahrensentwicklung *Dissertation*, Technische Universität Darmstadt, **1999**.
- [219] C. F. Lane *Synthesis* **1975**, 135-146.
- [220] A. Kreider, S. Sell, T. Kowalik, A. Hartwig, I. Grunwald *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, In Press, Accepted Manuscript.
- [221] R. Tian, O. Seitz, M. Li, W. W. Hu, Y. J. Chabal, J. Gao *Langmuir* **2010**, (26), 4563-4566.
- [222] D. R. Rand, D. Braeken, Y. Mulla, G. Borghs, C. Bartic *IEEE TRANSACTIONS ON NANOTECHNOLOGY* **2011**, (10), 102-110.

- [223] J. Wan, M. S. Thomas, S. Guthrie, V. I. Vullev *Annals of Biomedical Engineering* 2009, (37), 1190-1205.
- [224] D. Peelen, L. M. Smith *Langmuir* **2005**, (21), 266-271.
- [225] M. van der Veen, M. C. Stuart, W. Norde *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, (54), 136-142.
- [226] R. Sauter, Writer, *Introduction to QCM-D*. LOT-Oriel GmbH, **2012**.
- [227] H. Yamashita, S. Kawasaki, Y. Ichihashi, M. Harada *J. Phys. Chem. B* **1998**, (102), 5870-5875.
- [228] T. Yamaguchi, T. Jin, K. Tanabe *J. Phys. Chem.* 1986, (90), 3148-3152.
- [229] M. Hoefling, F. Iori, S. Corni, K.-E. Gottschalk *Langmuir* **2010**, (26), 8347-8351.
- [230] A. Schydlo, Reifbildung und -wachstum auf gekühlten Rohroberflächen *Dissertation*, Darmstadt **2010**.
- [231] T. Ehlers, Entwicklung und Charakterisierung von UV-härtbaren, transparenten Beschichtungen *Masterarbeit*, Universität Bremen, **2012**.

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- [1] A. Gaede-Koeler[†], **A. Kreider**[†], P. Canfield, M. Kleemeier and I. Grunwald* „Direct Measurement of the Thermal Hysteresis of Antifreeze Proteins (AFPs) using Sonocrystallization”, *Analytical Chemistry* **2012**, 84 (23), 10229-10235. ([†] **These authors contributed equally to this work**, *corresponding author)
- [2] **A. Kreider**, K. Richter, S. Sell, M. Fenske, C. Tornow, V. Stenzel and I. Grunwald* „Functionalization of a PDMS modified and plasma activated two-component polyurethane coating by surface attachment of enzymes”, *Applied Surface Science* **2013**, (273), 562-569.
- [3] **A. Kreider**, S. Sell, T. Kowalik, A. Hartwig* and I. Grunwald „Influence of immobilization protocol on the structure and function of surface bound proteins”, submitted in *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *accepted*.
- [4] **A. Kreider**, A. Hartwig and I. Grunwald* „Conformational Stability and Antifreeze Activity of Antifreeze Protein type III (*Macrozoarces americanus*) by Infrared Spectroscopy and Sonocrystallization”, in process.

Technische Veröffentlichungen

- [1] **A. Kreider**, B. Weber, V. Stenzel, C. Tornow, I. Grunwald „Smart coatings - Nature frost protection: Coupling antifreeze proteins to PUR coating inhibits ice deposition”, *European Coatings Journal* **2011**, (5), 34-39.
- [2] V. Stenzel, **A. Kreider**, N. Rehfeld, A. Starke „Functional coatings melting the ice – new anti ice technologies”, *European Coatings Journal* **2011**, (1), 36-40.

Patent

- [1] **A. Kreider**, Volkmar Stenzel, Yvonne Wilke, Nadin Refeld, Klaus Rischka, Ingo Grunwald, Lackschichten mit biofunktionalisierter Oberfläche und Verfahren zur Biofunktionalisierung von Lackschichten, DE 10 2011 006 278 A1

Vorträge

- [1] **Workshop „Biobased and Bioinspired Materials” in Bremen (Oktober 2012).** „Antifreeze-Protein based coatings”.
- [2] **Farbe und Lack Konferenz „Polyurethane für Hochleistungsbeschichtungen“ in Stuttgart (Juni 2011).** „Generierung von biomimetischen Oberflächen durch Ankopplung von Frostschutzproteinen auf einem 2K-PUR-Lacksystem”.
- [3] **European Coatings Congress in Nürnberg (März 2011).** „Generation of biomimetic surfaces by coupling antifreeze proteins to a 2K-PUR coating system”.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 30. Oktober 1981
Geburtsort: Frunse, Union der Sozialistischen Sowjetrepubliken (UdSSR)
Übersiedlung in die BRD: Januar 1997
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder (2009, 2011, 2013)

Abschlüsse

1999-2000 Eichbergschule Lauterbach: Mittlere Reife
2001-2003 Zweijährige Berufsfachschule Chemietechnik „Staatlich geprüfter chemisch-technischer Assistent“.
2003-2004 Max-Eyth-Schule Alsfeld. Abschluss: Fachhochschulreife

Studium, Dissertation

2004-2009 Hochschule Darmstadt – University of Applied Sciences.
Akademischer Grad: Diplom-Chemieingenieur (Fachhochschule).
2009-2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (IFAM) in Bremen. Abteilung: „Lacktechnik“ und Abteilung „Klebstoffe und Polymerchemie“, Anfertigung dieser Dissertation.

Zusätzliche Qualifikationen

Sprachkenntnisse	Russisch	(Muttersprache)
	Deutsch	(verhandlungssicher)
	Englisch	(fließend)
EDV-Kenntnisse	MS Office-Programme, Origin 12.0, Discovery Studio TM ViewerPro 5.0, Chem Bio Draw Ultra 12.0, Corel DRAW 12.0.	
Analytische Methoden	Schwingungsspektroskopie (Reflexionsspektroskopie (ATR-FT-IR, PM-IRRAS) und Transmissionsspektroskopie (AquaSpec TM)), Elektronenspektroskopie (UV/Vis-Spektroskopie), DSC, Kontaktwinkelmessung, Mithras LB 940 Mikroplattenleser und Fluoreszenzmikroskopie.	